

Posible transmisión vertical de virus de papiloma humano en niños cuyas madres presentan antecedentes de infección viral

Dras. Zoraya De Guglielmo¹, Yrneh Prado¹, Marycarmen Ferreiro², Maira Ávila¹, Dayahíndara Veitía¹, Marla Ladera¹, Andreína Fernandes¹, María Correnti¹

¹Instituto de Oncología y Hematología-MPPS, ²Hospital Universitario de Caracas

RESUMEN

Objetivo: Detección y tipificación de virus de papiloma humano en muestras de niños cuyas madres tienen historia asociada al virus.

Métodos: Estudio transversal y descriptivo. Se procesaron 66 hisopados perianales de niños con un promedio de edad de 18 meses atendidos en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas. La detección viral se realizó mediante PCR con iniciadores genéricos MY11 y MY09; la tipificación de las muestras positivas en la detección se llevó a cabo mediante PCR múltiple.

Resultados: Se obtuvo un porcentaje de positividad de 54,5 % y se identificó VPH de bajo riesgo oncogénico en 47,2 %, ADN viral de alto riesgo en 13,88 % e infecciones mixtas con tipos de alto y bajo riesgo oncogénico en 5,55 % de las muestras positivas. El 33,33 % de estas muestras no pudo ser tipificado con la metodología utilizada.

Conclusiones: Aunque no se tienen datos del tipo viral en las madres para hacer comparaciones con los tipos identificados en los niños, estos resultados ponen en evidencia la posible transmisión vertical del VPH, considerando los antecedentes maternos, la corta edad de los niños y que la condición de abuso sexual fue descartada. Es recomendable hacer el seguimiento de la población estudiada con la incorporación de la evaluación de muestras obtenidas de los padres.

Palabras clave: VPH. Transmisión vertical. Niños. PCR

SUMMARY

Objective: Detection and typing of Human Papillomavirus in samples of children whose mothers have a history associated with the virus.

Methods: Transversal and descriptive study. Perianal swabs of 66 children with an average age of 18 months treated in the Service of Dermatology, University Hospital of Caracas, were processed. Viral detection was performed by PCR with MY11 and MY09 generic primers; typing of positive samples was performed by multiplex PCR.

Results: A positive percentage of 54.5 % was obtained and low oncogenic risk HPV identified in 47.2 %, high-risk viral DNA in 13.88 % and mixed infections with types of high and low oncogenic risk in 5.55 % of the positive samples. 33.33 % of these samples could not be typed with the used methodology.

Conclusions: Although the viral type is unknown in mothers to make comparisons with the types identified in children, these results highlight the possible vertical transmission of HPV, considering maternal history, the young age of the children and that the condition of sexual abuse was ruled out. It is recommended to monitor the studied population including the evaluation of samples obtained from the parents.

Key words: HPV. Vertical transmission. Children. PCR Pregnancy. Recurrent fetal loss.

INTRODUCCIÓN

El virus de papiloma humano (VPH) es el agente etiológico del cáncer de cuello uterino y también se le ha relacionado con cáncer de cabeza y cuello y cáncer de mama. En general, se transmite por contacto sexual, afectando principalmente a adultos sexualmente activos. En el caso de niños se han descrito infecciones cutáneas así como en la mucosa

oral, nasal y genital, con un notable incremento en la incidencia de verrugas anogenitales en prepúberes. Se considera que las vías de transmisión viral a la mucosa oral o genital de recién nacidos incluyen la transmisión perinatal, ya sea durante el parto natural, la cesárea o en el útero (a través del semen durante la fertilización, por una infección ascendente desde el

tracto genital de la madre o a través de la placenta), abuso sexual, auto y heteroinoculación y por contacto directo con objetos o superficies contaminados (1,2).

Al igual que en adultos, la infección por VPH en niños puede permanecer subclínica o producir verrugas o papilomatosis respiratoria recurrente, por lo que es importante la evaluación, mediante métodos moleculares, de niños con madres positivas para el VPH. Esto toma más relevancia considerando la existencia de programas de vacunación a nivel mundial, resaltando al mismo tiempo el interés en el estudio de las vías de transmisión del virus. En este orden de ideas, se ha señalado que el VPH puede ser transmitido tanto a la mucosa oral como a la genital, por lo que el riesgo de displasia genital y cáncer en adolescentes y adultos jóvenes con base en la transmisión vertical del virus puede ser tan importante como la incidencia de papilomatosis oral y respiratoria asociada al VPH, enfermedad que ha cobrado un gran interés pediátrico en los últimos años (3).

También se han realizado estudios basados en la detección serológica de anticuerpos para VPH, observándose que la seropositividad es más común en niños y adolescentes que en adultos. Sin embargo, se desconoce el efecto a futuro de estos anticuerpos detectados en la infancia, sugiriéndose que pudieran neutralizar al virus o ayudarlo a escapar del sistema de defensa del hospedador (4-6).

El objetivo de este trabajo fue la detección y tipificación de VPH mediante PCR en muestras de niños atendidos en el Hospital Universitario de Caracas, con madres positivas para el virus.

MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal y descriptivo que incluyó 66 muestras perianales tomadas con hisopo de dacron (Fisher Brand) por médicos especialistas a niños atendidos en la Consulta de infecciones de transmisión sexual (ITS) del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas, Venezuela, entre enero 2009-febrero 2014, cuyas madres tenían historia de VPH. El promedio de edad fue 18 meses, comprendiendo edades entre 1 mes y 36 meses. Aproximadamente el 30 % de los niños presentó verrugas o condilomas perianales. Es importante destacar que al evaluar enfermedades de transmisión sexual en niños, nunca se descarta el abuso sexual como vía de contagio y son necesarios 5 criterios para confirmar o negar: cambios morfológicos mediante evaluación clínica, evaluación de trabajadores sociales, análisis forense, hallazgos moleculares y

estudios de la fiscalía. Con base en esto, se descartó esta condición en la población en estudio.

Los hisopos fueron mantenidos a 4 °C en tubos colectores con solución fisiológica hasta el momento de su procesamiento.

Extracción de ADN. Las células recolectadas en los hisopos fueron desprendidas por agitación y sedimentadas por centrifugación a 14 000 rpm durante 10 minutos. La extracción del ADN se realizó con el “Pure Link Genomic DNA Minikit” de Invitrogen, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Detección y tipificación de VPH. Para la detección del ADN viral se realizó una PCR con *primers* genéricos MY09/MY11, usando como control interno la amplificación del gen de *B*-globina con los *primers* PC04 y GH20, según un protocolo descrito previamente, obteniéndose productos de 450 y 268 pb respectivamente (7).

Las muestras positivas en la detección fueron tipificadas con el kit “HPV4 ACE Screening” de Seegene, siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit permite la identificación de VPH de bajo riesgo tipos 6/11 (producto de 302 pb) y de alto riesgo oncogénico (producto de 465 pb), diferenciando los tipos 16 (588 pb) y 18 (230 pb). Presenta, además, un control interno correspondiente al gen de tubulina (producto de 1 000 pb).

Los productos de ambas amplificaciones fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, buffer TBE 1X, tinción con Syber Safe (Invitrogen) y exposición a luz UV en foto documentador Chemi Doc (BIORAD) para registro fotográfico.

El tratamiento estadístico de los datos se basó en análisis descriptivos de frecuencias absolutas y relativas de la detección y tipificación viral.

RESULTADOS

De las 66 muestras evaluadas, 18 (27,27 %) presentaron material insuficiente para la PCR, lo cual se evidenció al evaluar la concentración de ácidos nucleicos y se corroboró en la electroforesis al no observarse productos de amplificación; 36 muestras (54,5 %) resultaron positivas en la detección viral mostrando la banda esperada de 450 pb y 12 (18,18 %) fueron negativas (solo presentaron la banda de 268 pb correspondiente al control interno) (ver Cuadro 1, Figura 1).

En la tipificación de las muestras positivas se identificó ADN viral de bajo riesgo (tipos 6 y 11) en 17/36 muestras (47,2 %), ADN viral de alto

TRANSMISIÓN VERTICAL DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Cuadro 1.

Detección y tipificación de VPH en muestras perianales de niños.

Muestras positivas				Muestras negativas insuficiente	Muestras con material insuficiente
36/66 (54,5%)				12/66 (18,18%)	18/66 (27,27%)
BR	AR	BR/AR	NT		
17/36 (47,2%)	5/36 (13,8%)	2/36 (5,55%)	12/36 (33,3%)		

BR: bajo riesgo oncogénico; AR: alto riesgo oncogénico; NT: no tipificable por la metodología utilizada.

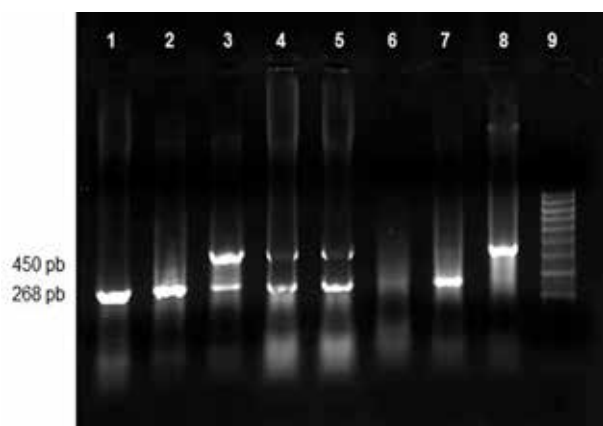


Figura 1. Detección de VPH mediante PCR con primers genéricos MY11/MY098. 1: control negativo: (mezcla + ADN de individuo sano) se observa la banda de 268 pb correspondiente al control interno; 2-7: grupo de muestras en estudio; 8: control positivo con la banda de 450 pb correspondiente al fragmento amplificado del genoma viral y la banda de 268 pb correspondiente al control interno; 9: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen).

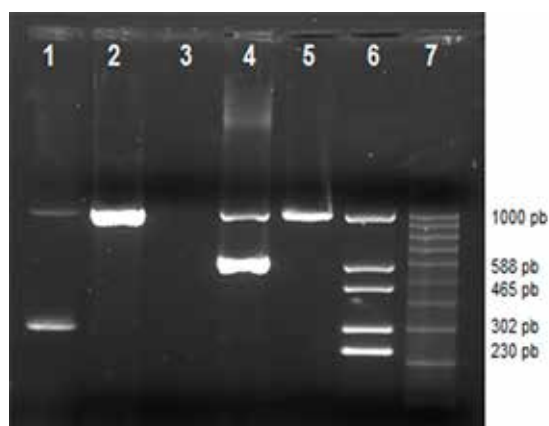


Figura 2. Tipificación de VPH mediante PCR múltiple. 1-5: muestras en estudio; 6: control positivo donde se observan bandas correspondientes a distintos tipos virales (230 pb: tipo 18, 302 pb: tipos 6/11, 465 pb: banda genérica para tipos de alto riesgo oncogénico, 588 pb: tipo 16); 7: marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen).

riesgo (tipos 16 y 18) en 5/36 muestras (13,88 %) e infecciones mixtas con tipos de alto y bajo riesgo oncogénico (tipos 6/11 y 18) en 2/36 muestras (5,55 %). El 33,33 % de las muestras positivas (12/36) no pudo ser tipificado con el kit (ver Cuadro 1, Figura 2); esto pudiera deberse a que presentaban tipos virales no detectados en dicho kit, tomando en cuenta que solo identifica los 2 tipos virales de bajo riesgo (6/11) y 2 de los tipos de alto riesgo oncogénico (16 y 18) registrados con mayor frecuencia a nivel mundial. En este sentido, pudieran señalar la necesidad de usar métodos más sensibles y/o con un rango más amplio de tipificación para este tipo de muestras y, en general, para evaluar la población venezolana.

DISCUSIÓN

La evaluación de la transmisión de VPH en niños por vías distintas al abuso sexual, especialmente la transmisión vertical entre madre-hijo, es de gran interés debido al incremento observado en la incidencia de papilomatosis respiratoria y verrugas anogenitales en prepúberes; también hay que tomar en cuenta el papel de esta transmisión como factor de riesgo en la adquisición de VPH al momento de diseñar programas de vacunación y estrategias de prevención, incluyendo en este punto su posible efecto en el riesgo de desarrollo de cáncer y displasia genital en adolescentes y adultos jóvenes (1,3). Así lo han

señalado distintos investigadores, como Smith y col. (3) (2010) quienes estudiando la transmisión vertical entre madres y sus hijos recién nacidos, encontraron una concordancia de 71 % entre los tipos de VPH en las mucosas oral y genital y resaltaron la importancia de este tipo de estudios para la eficacia de programas de vacunación.

Los resultados de distintos trabajos realizados en cuanto al riesgo de transmisión vertical de ADN de VPH a las mucosas oral o genital de recién nacidos son variables, y van desde muy bajos, entre 1 %-5 %, hasta altos, entre 40 %-80 % (3). No obstante, aun en trabajos donde se obtuvo bajo porcentaje de transmisión, se encontró que el riesgo asociado era mayor si la madre presentó lesiones asociadas o resultó positiva al ADN de VPH próxima al parto. Así, estas mujeres tuvieron una tasa de transmisión de 47 % en comparación a una de 23 % en mujeres con historia de VPH sin lesiones al momento del parto (8,9). También se ha señalado que este riesgo es mayor en partos naturales que en cesáreas (aunque en algunos estudios no se encontró asociación entre el tipo de nacimiento y la transmisión vertical del virus) y que la positividad en recién nacidos puede deberse a contaminación con células infectadas de la madre, particularmente cuando se toma la muestra a pocos días o semanas después del nacimiento. Por ello algunos investigadores recomiendan hacer esta toma entre 3 semanas y 6 meses después del nacimiento (2,9,10). En el presente estudio la toma de la muestra se realizó a partir del mes de nacimiento.

En cuanto a la divergencia en los porcentajes de detección de VPH, se ha explicado que puede ser consecuencia de diferencias en el momento y el procedimiento de toma de la muestra, así como en la sensibilidad del método de detección utilizado (2).

En este trabajo se llevó a cabo la detección de ADN de VPH en muestras perianales de niños cuyas madres tienen historia de enfermedad relacionada al virus. El promedio de edad de los infantes fue 18 meses, siendo la edad menor 1 mes (4 semanas), y se logró la detección del virus en aproximadamente el 55 % de la muestra evaluada, ubicándose este resultado dentro del rango alto de detección, según estudios realizados previamente (3).

Esta evaluación no se realizó en las madres de los niños incluidos en la muestra estudiada, lo cual se ha señalado como un elemento importante en la evaluación del riesgo de VPH infantil. En tal sentido, en un estudio prospectivo realizado en Finlandia donde se evaluó durante 2 años consecutivos, la transmisión

de VPH entre madres y sus hijas menores de 8 años mediante PCR anidada, se concluyó que tanto la infección viral cervical persistente como la infección oral subclínica en la madre aumentan el riesgo de VPH infantil, siendo los 6 meses la edad crítica señalada por los investigadores para adquirir o estar libre de ADN de VPH de alto riesgo oncogénico (11).

Estudios previos realizados por Amabili y col. (12) en la población infantil venezolana encontraron una positividad viral de 82 % al evaluar mediante PCR con *primers* genéricos muestras de niños y adolescentes entre 2 y 18 años, con predominio del sexo femenino (73 %) y del VPH tipo 6 de bajo riesgo (48 %), seguido del tipo 11, también de bajo riesgo, del tipo 18 de alto riesgo oncogénico e infecciones mixtas en baja proporción. Los tipos virales detectados por estos autores concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, pero la detección fue más alta (82 % de positividad en comparación al 42 % mencionado); esto puede deberse a variaciones en las características de las poblaciones estudiadas, resaltando que en el presente trabajo la edad promedio fue de 18 meses y que la muestra no se había iniciado sexualmente.

Recientemente, también en Venezuela, Mora y col. (13) analizaron los factores asociados con la infección por VPH en niñas menores de 8 años que convivían con pacientes infectadas por el virus, encontrando una alta prevalencia viral de bajo riesgo oncogénico (71,4 %). Los autores señalaron que prácticas comunes entre familias de condición socioeconómica diversa, tales como lavar la ropa de la madre en conjunto con la de la niña y el uso compartido de toallas, sábanas y jabón de baño, son reflejo del desconocimiento por parte de las madres de las vías de transmisión viral y sus consecuencias clínicas a mediano y largo plazo y, además, esta conducta pudiera favorecer la transmisión vertical del VPH sin la ocurrencia de contacto sexual. Esto resalta la importancia de programas de educación sobre el tema para la población.

Distintos investigadores trabajando sobre transmisión vertical de VPH han realizado la evaluación tanto de los niños en riesgo como de las madres y/o padres para calcular concordancia de positividad y tipificación viral, aduciendo que la comparación padres-hijo es importante, si bien no imprescindible, para demostrar la ocurrencia de esta vía de contagio (1-3). Aunque en este trabajo no se cuenta con los tipos virales de las madres y, en consecuencia, fue imposible evaluar la concordancia con los tipos de VPH identificados en los niños,

los resultados obtenidos en la detección ponen en evidencia la posible transmisión vertical madre-hijo del virus, considerando los antecedentes maternos y que si bien al evaluar ITS en infantes no debe descartarse el abuso sexual, esta condición fue desestimada por los especialistas en la totalidad de la muestra. Sin embargo, cabe mencionar que aquellos casos donde se detectó VPH de alto riesgo oncogénico ameritan un seguimiento médico más estricto, debido a las manifestaciones clínicas y patologías asociadas a estos tipos virales. En este sentido, Mora y col. (13) señalaron que en su estudio la detección de VPH de bajo riesgo oncogénico en un 71,4 % de la muestra conformada por niñas donde se descartó el contacto sexual, puso en evidencia la ocurrencia de transmisión vertical del virus y, eventualmente, dicha transmisión vertical pudiera involucrar tipos de alto riesgo oncogénico.

Cabe mencionar que este tipo de estudios contribuye con un mejor control de las enfermedades asociadas al VPH, así como con la mayor efectividad de programas de prevención y vacunación. A futuro es recomendable estudiar la prevalencia de la positividad al ADN de VPH y las manifestaciones clínicas observadas con el tiempo en los infantes positivos al virus, así como evaluar la concordancia de tipos virales entre madres y recién nacidos, incluyendo sus hábitos o prácticas comunes, lo cual contribuirá a la determinación del riesgo de adquisición del virus por transmisión vertical en niños con madres positivas y su impacto epidemiológico.

REFERENCIAS

1. Syrjonen S, Puronen M. Human papillomavirus infections in children: The potential role of maternal transmission. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):259-274.
2. Rintala M, Grenman S, Puranen M, Isolauri E, Ekblad U, Kero P, et al. Transmission of high risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: A prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):376-381.
3. Smith E, Parker M, Rubenstein L, Haugen T, Hamsikova E, Turek L. Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010;1-7.
4. Bonne W, Kashima H, Leventhal B, Mounts P, Rose R, Reichman R, et al. Antibody response to HPV type 11 in children with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis (RRP). *Virology*. 1992;188:384-387.
5. Cason J, Kambo P, Best J, McCance D. Detection of antibodies to a linear epitope on the major coat protein (L1) of HPV type 16 in sera from patients with cervical intraepithelial neoplasia and children. *Int J Cancer*. 1992;50:349-355.
6. Cason J, Kaye J, Jewers R, Kambo P, Bible J. Perinatal infection and persistence of HPV types 16 and 18 in infants. *J Med Virol*. 1995;47:209-218.
7. De Guglielmo Z, Ávila M, Correnti M, Veitía D, Cavazza M. Evaluación, mediante RCP, de la infección por el virus de papiloma humano en muestras de pacientes con diagnóstico clínico o citológico. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2008;68:240-247.
8. Watts D, Koutsky L, Holmes K, Goldman D, Kuypers J, Kiviat N, et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: Results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(2):365-373.
9. Medeiros L, Braganca A, Balbinot J, Ruviano R, Berwanger O, Bozzetti M, et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: A systematic quantitative review. *Cad Saúde Pública*. 2005;21:1006-1015.
10. Smith E, Ritchie J, Yankowitz J, Swarnavel S, Wang D, Haugen T, et al. Human papillomavirus prevalence and types in newborns and parents: Concordance and modes of transmission. *Sex Transm Dis*. 2004;31(1):57-62.
11. Rintala M, Grenman S, Puranen M, Isolauri E, Ekblad U. Riesgo de transmisión de virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo entre los padres y los bebés: un estudio prospectivo de VPH en las familias en Finlandia. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1376-1381.
12. Amabili M, Michelli P, Castellanos A, Arteaga A, De Suárez, L. Estudio molecular de la infección por el virus papiloma humano (VPH) en niños. Tipificación y correlación clínico-patológica. XII Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología. VI Congreso Venezolano de Infectología. II Simposio Latinoamericano y del Caribe de Infecciones de Transmisión Sexual. 15 al 18 mayo de 2005. Caracas, Venezuela. Disponible en: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeVeintidos/Congreso/ArchivosPDF/Codigo175.pdf>. Consulta: septiembre 2014.
13. Mora E, Perdomo L, Muñoz M, Guevara H, Cardozo R, Ortunio M. Infección por VPH en niñas sin contacto sexual. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2013;73:108-115.

Financiamiento: Misión Ciencias 2007001088

Correspondencia: Dra. Zoraya De Guglielmo. Laboratorio de Genética Molecular- Instituto de Oncología y Hematología. Calle Minerva, entre Facultad de Odontología y Escuela de Educación. Ciudad Universitaria, Urbanización Los Chaguaramos, Caracas. Teléfono: 02126050647. Email: zdegugli@gmail.com