

Desarrollo de pruebas serológicas y de amplificación molecular proviral para el estudio en pacientes con tuberculosis y con serología indeterminada al HTLV

Development and testing serologic provirus amplification for molecular study in patients with tuberculosis and the uncertain serology HTLV

EGMA MAYTA HUATUCO,¹ EDISON LUIZ DURIGON,² ARGELY SEGUIL FLORES,³ NELLY BORJA SANTA CRUZ,⁴
TATIANE ASSONE DOS SANTOS,⁵ KAREN GAESTER,⁶ JORGE CASSEB.⁷

-
- 1 Laboratorio de Virología Clínica Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Doctor y postdoctorado Universidad de Sao Paulo (USP) Brasil. Docente a D.E especialista en virología. E-mail: emaytah@unmsm.edu.pe
 - 2 Laboratorio de Virología. Instituto de Ciencias Biomédicas. USP. Categoría Profesor titular. Línea de Investigación: Especialista en virología clínica molecular. Email: eldurigo@usp.br
 - 3 Laboratorio de Virología Clínica Molecular Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. E-mail: argelys44@hotmail.com
 - 4 Laboratorio de Mycobacterium tuberculosis. Dpto. de Microbiología Médica Facultad de Medicina Humana UNMSM. E-mail: nabsc@unmsm.edu.pe
 - 5 Biomedicina Laboratorio de Investigación Médica Instituto de Medicina Tropical Universidad de Sao Paulo. Brasil. E-mail: tatianeassone@usp.br
 - 6 Biomedicina Laboratorio de Investigación Médica. Instituto Medicina Tropical. Universidad de Sao Paulo. Brasil. E-mail: karengaester@gmail.com
 - 7 Responsable del laboratorio de inmunovirología del LIM 56 Instituto de Medicina Tropical Universidad de São Paulo. Brasil. Profesor de enfermedades Infecciosas Del IMT-USP. Profesor Docente por la UNIFESP. Facultad de Medicina-USP. E-mail: jcasseb10@gmail.com

Resumen

En el Perú existen regiones geográficas endémicas al virus linfotrópico humano de células T (HTLV), perteneciente a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* género *Deltaretrovirus*. Las investigaciones realizadas sobre coinfección de virus asociado a pacientes con tuberculosis (TB) y con serología indeterminada son limitadas. En el presente trabajo, se efectuó el estudio de 14 casos con perfil serológico indeterminado al HTLV, de un total de 151 pacientes con diagnóstico de tuberculosis y en tratamiento ambulatorio. Se realizaron pruebas preliminares de tamizaje Elisa y Western Blot para desarrollar los protocolos de amplificación molecular de Nested-PCR para HTLV, a partir de células mononucleares de sangre periférica. Para evidenciar la presencia de los dos tipos de HTLV, fueron usadas endonucleasas como enzimas de restricción, que hidrolizan el DNA en secuencias específicas de los segmentos del genoma proviral. Se confirmó 2/14 (14.2 %) casos positivos a HTLV considerando el protocolo de prototipo eficaz para la detección de virus linfotrópicos en coinfectados con tuberculosis y la técnica favoreció la detección de los virus HTLV-1 y HTLV-2, en esta población coinfectada. En el estudio se demostró con el protocolo de amplificación proviral la presencia de HTLV en coinfectados con tuberculosis y con pruebas complementarias de endonucleasas de restricción. Por diferencias en sus migraciones electroforéticas se evidenció la presencia de HTLV-1 y HTLV-2 que está circulando en pacientes ambulatorios en tratamiento de tuberculosis, tornándose una fuente de dispersión del virus. El establecimiento de métodos de laboratorio optimizados previene la dispersión del virus en el Perú por ser endémico a ambos agentes patógenos. Resaltamos, por tanto, la gran importancia del seguimiento clínico de estos pacientes, faltando estudios de seroconversión. Los resultados nos permiten sugerir e implementar esta técnica de diagnóstico molecular en los centros de salud, esencialmente cuando los perfiles de diagnósticos serológicos son dudosos, no usar la técnica como prueba de tamizaje. El establecimiento de la técnica en los laboratorios va a contribuir significativamente para la definición del estatus de infección retroviral de esos individuos para un aconsejamiento clínico oportuno al paciente. Continuar con los estudios de padronizar y caracterización molecular por la existencia de subtipos virales.

Palabras clave: Human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1), Human T-lymphotropic virus type 2(HTLV-2), Nested-PCR Endonucleasas, TB Coinfección.

Abstract

In Peru there is geographical regions endemic for human T-cell lymphotropic virus (HTLV) belongs to the family *Retroviridae* subfamily gender *Orthoretrovirinae* *Deltaretrovirus*. Research on virus co infection associated with patients with tuberculosis (TB) and indeterminate serology is limited. This paper conducted the study of 14 cases with indeterminate HTLV serologic profile of a total of 151 patients diagnosed with tuberculosis and outpatient treatment. Preliminary screening tests ELISA and Western blotting were performed to develop molecular protocols Nested-PCR amplification for HTLV, from peripheral blood mononuclear cells. To detect the presence of the two types of HTLV endonucleases were used as restriction enzymes that hydrolyze the DNA at specific sequences of the provirus genome segments. 2/14 (14.2%) positive cases were confirmed HTLV considering protocol for detecting effective lymphotropic virus in co-infected with tuberculosis prototype favored technique and detection of HTLV-1 and HTLV-2 in this coinfecting population. The study clearly demonstrated the protocol proviral amplification presence of HTLV was determined in co-infected with tuberculosis and complementary tests of restriction endonucleases, by differences in their electrophoretic migration presence HTLV_I and HTLV-II circulating in outpatient evidenced in TB treatment, becoming a risk of spreading the virus sources. Establishing laboratory methods optimized prevents virus spread in Peru for being endemic to both pathogens. We highlight hence the great importance of clinical follow-up studies of these patients seroconversion missing. The results allow us to suggest implementing this technique in molecular diagnostic health centers, essentially when the profiles of serological diagnoses are uncertain, do not use the technique as a screening test. The establishment of the art laboratories will contribute significantly to the definition of the status of retroviral infection of these individuals for appropriate clinical consejamiento patient. Continue to standardize studies and molecular characterization for existence of viral subtypes.

Keywords: Human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1), Human T-lymphotropic virus type 2(HTLV-2), Nested-PCR, Endonucleases, TB coinfection.

I. Introducción

Entre los años de 1980 y 1982, los virus linotrópicos de células T humana tipo 1 y 2 (HTLV-1/2) fueron los primeros retrovirus detectados en humanos. El virus está presente en individuos sintomáticos y asintomáticos. El HTLV-1 está asociado a la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL) y mielopatía asociado a HTLV-1 / paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). La infección por el HTLV-1 también está asociada a una serie de enfermedades inmunológicas como poliomiositis, artritis, uveítis. Las vías de transmisión más frecuentes es por vía vertical de madre a hijo mediante la lactancia, por vía sexual, parenteral (transfusión sanguínea, hemoderivados), por transfusión la diseminación del virus es mucho más eficaz en poblaciones no endémicas. Durante los últimos años, las pruebas para detectar HTLV-1 fueron implantadas en varios países; esta importante medida de salud pública excluye a los individuos seropositivos del grupo de donadores evitando las nuevas infecciones en la población en general. En el Perú, en un primer momento las transfusiones se realizaban con sangre no testada para HTLV-1/2 que favoreció su propagación principalmente en zonas endémicas. Actualmente son testadas, sin embargo, en algunos casos, las técnicas utilizadas no detectan y son consideradas seroindeterminados, la no detección certera incrementa la dispersión de los virus

Los primeros trabajos orientados a los patrones como seroindeterminados, se remonta a los estudios en donadores de sangre tamizados para HTLV-1/2, que ha demostrado una actividad incompleta de anticuerpos contra los antígenos virales, utilizando la técnica de ELISA y Western Blot (WB) (Mauclere et al. 1997). Posteriormente, se realizó un estudio relacionado por Martínez-Nieto et al. (2007). Los trabajos descritos sobre seroindeterminados infectados con tuberculosis no existen en la literatura.

La investigación realizada por Sabino et al. (1999) con donadores de sangre empleando INNOLIA HTLV-1/2 para confirmar la prueba de diagnóstico al HTLV reportó el 1% de indeterminados, Santos et al. (2003) al investigar al HTLV-1 en Fortaleza-Ceara-Brasil en donadores

de sangre utilizando Elisa y Western (WB) encontraron 61,8% de patrones de indeterminados, luego empleando otras técnicas de amplificación genómica del virus identificaron un 22% de positivos para el HTLV-1 en las muestras indeterminadas. En Costa Rica, entre diciembre del 2002 y diciembre del 2004, los patrones indeterminados representaron un 0,12% del total de donantes tamizados, y se obtuvo un 0,02% de positivos y un 0,06% de negativos (García et al. 2006). Otros investigadores también han encontrado patrones de Western Blot indeterminados para HTLV-1 que después de un periodo de seroconversión ocurrió un viraje serológico positivo de los pacientes (Cesaire et al. 1999).

El patrón seroindeterminado más común se ha definido como un perfil de proteínas específicas de grupo donde se presentan las bandas p19, p26, p28, p32, p36 y p53 sin la presencia de la banda p24 o alguna de las glicoproteínas correspondientes al gen de la envoltura (gp 46, gp 61/68) (Mauclere et al., 1997; Rouet et al., 2001). Este perfil se ha denominado HGIP (HTLVgag Indeterminate Profile Pattern) y se ha descrito principalmente en zonas tropicales endémicas como la nuestra (Rouet et al., 2001; Mahieux et al., 2000; Teixeira et al., 2003; Ximena et al. 2007).

En nuestro país hay escasa información referida al conocimiento científico de los pacientes seroindeterminados al HTLV-1 y de aquellos que desarrollan seroconversión en un tiempo no determinado, por lo que no son detectados los antígenos-anticuerpos en los Centros de Salud durante el diagnóstico al virus HTLV-1, sabiendo que nuestro país es endémico al HTLV-1 y a la tuberculosis, en el que se dan las condiciones para la coinfección, categorizando como complicación infecciosa (Gotuzzo et al. 2010). En el diagnóstico de HTLV-1 en los centros de salud no se toma importancia a los pacientes seroindeterminados, por lo que constituye un alto riesgo en el caso de transfusión sanguínea y en los coinfectados con TBC aceleran su mortalidad. Mayta et al. (2007) estudiando al HTLV-1/2 en individuos coinfectados atendidos en el IMT, con virus, parásitos, entre otros, reportan el 1,83 % de positivos al virus HTLV-1 y 5,28% de indeterminados, los grupos de estudios presentan alta frecuencia de coinfección viral con dos agentes etiológicos hasta en

un 68,49% . Asimismo, Mayta et al. (2011) observan que entre los pacientes que concurren al Programa de Tratamiento Ambulatorio con tuberculosis (TBC) algunos de ellos son seroindeterminados al HTLV-1, por lo que estos grupos de seroindeterminados constituyen fuentes de dispersión del virus.

II. Materiales y métodos

Material biológico

Se analizaron muestras de suero y células mononucleares de 14/151 casos de seroindeterminados al HTLV, con diagnóstico clínico microbiológico de TB y con TBMDR procedentes del Programa de Control de Tuberculosis (PCT) de la Red Asistencial Almenara (RAA). A esta red pertenecen Guillermo Almenara Irigoyen, Hospital de Emer-

gencia Grau, Centro Asistencial Primario (CAP) III Huaycán, Clínica Chosica y Hospital II de Vitarate. Los individuos son pacientes ambulatorios que acuden al hospital para el tratamiento con fármacos antituberculo, en este momento se realiza la toma de muestra.

Colecta de sueros

En los formularios cada paciente firmó su consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica, mediante punción venosa y en tubos vacutainer con gel. Estas muestras fueron procesadas mediante centrifugación para separar los sueros, los cuales se conservaron a temperatura de -4 °C en el laboratorio de Virología Clínica Molecular hasta la realización de las pruebas serológicas de acuerdo a la Figura 1.

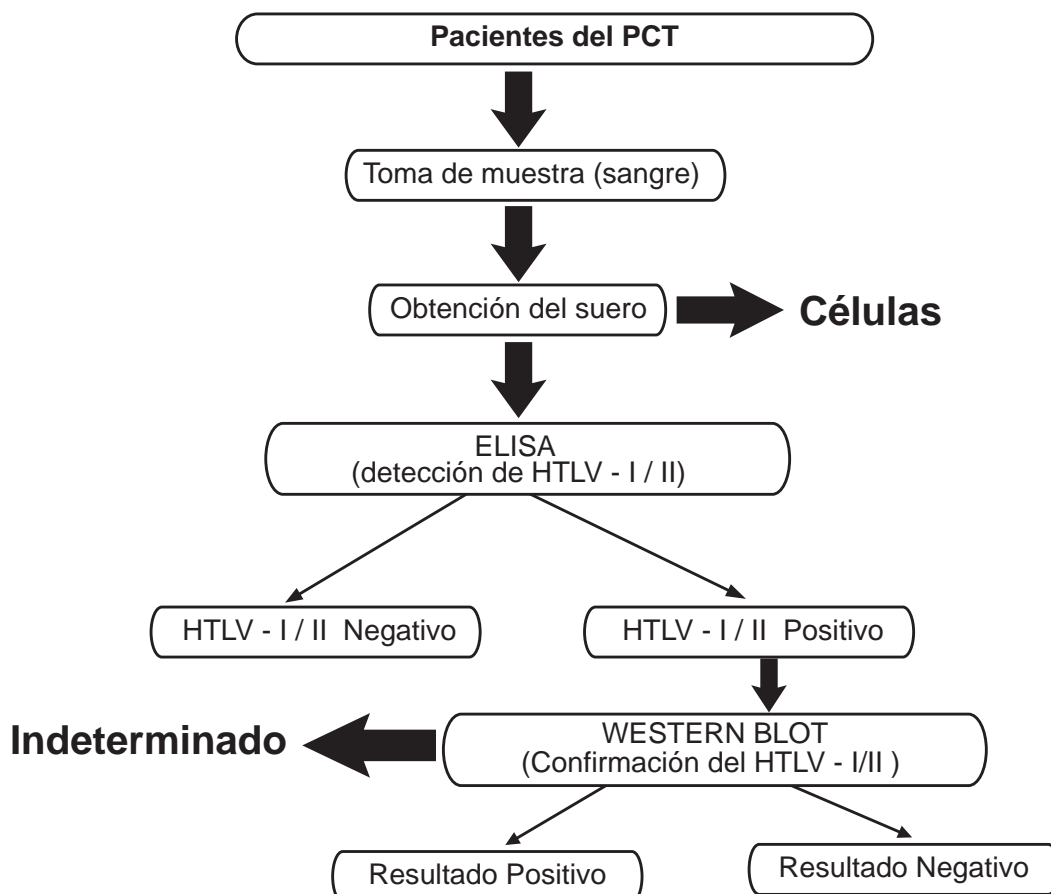


Figura1. Procedimiento experimental para detección de anticuerpos al HTLV.

Colecta de células mononucleares de sangre periférica

La metodología empleada para la colecta de sangre se realiza con anticoagulante ácido etileno-diamino tetra cético (EDTA), un volumen de esta solución se diluye en cuatro volúmenes de solución salina, el lavado se realiza por tres veces, en la última se incorporan dos volúmenes de histopaque 1077 (SIGMA) y luego es sometida a centrifugación para el aislamiento de células como linfocitos, estos glóbulos blancos fueron lavados tres veces con solución salina al 0.9%, se cuantifica y están listas para ser almacenadas a -12 °C hasta el momento de ser sometidas a extracción del DNA. (Fig. 2).

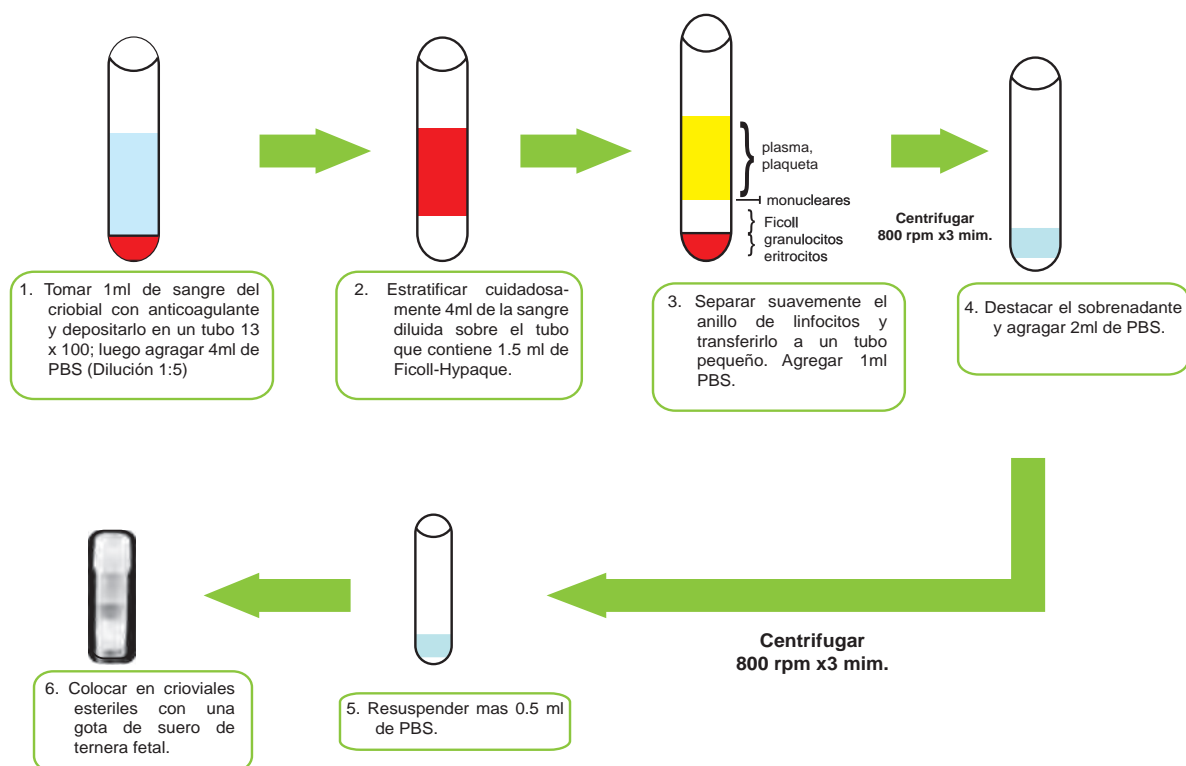


Figura 2. Protocolo de procesamiento de obtención de células mononucleares.

Evaluación serológica de Virus Linfotrópico Humano de Células T

Para la detección de anticuerpos contra el HTLV-1 se utilizó la prueba de Elisa (Bioelisa HTLV-I + II 5.0 - Biokit) y para la confirmación, Western Blot (INNO-LIA HTLV-I/II – Innogenetics). El ensayo de inmunoadsorción enzimática Elisa permitió determinar la presencia de anticuerpos IgG anti –HTLV-1/ 2. Los pocillos de poliestireno de la microplaca están cubiertos con tres diferentes proteínas recombinantes de HTLV que corresponden a los segmentos altamente antigénicos de los virus HTLV-1 y HTLV-2. El conjugado presenta una triple proteína recombinante, marcada con peroxidasa de rábano. El suero se coloca en

el diluyente que contiene el conjugado, se incuba de acuerdo a las especificaciones del productor.

Si hay presencia de anticuerpos específicos de HTLV-1/2 (Ig A, IgG e IgM) se unirán a los antígenos inmovilizados en la fase sólida de la microplaca y al antígeno trifusionado del conjugado. Pasado el tiempo de incubación se lava para eliminar los componentes que no interaccionaron. Luego se añade a cada pocillo una solución de sustrato cromógeno 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB). La enzima peroxidasa modifica el sustrato en presencia de un cromógeno produciendo un producto coloreado que fue medido usando el espectrofotómetro. La presencia de anticuerpos específicos se determina por la presencia de un

color azul, luego se adiciona una solución de bloqueo ácido sulfúrico evidenciando un color amarillo. La intensidad del producto de color amarillo se mide a 450 nm en una lectora de Elisa y es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra. Las muestras con valores de absorbancia mayores a los controles y el valor de cutoff se consideraron reactivas de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Western Blot (INNO-LIA HTLV-I/II – Innogenetics)

Es un ensayo inmunoenzimático que se usó para confirmar la presencia de anticuerpos contra el HTLV-I y HTLV-II. Los antígenos utilizados son proteínas inmunodominantes recombinantes purificadas y fijadas en una membrana de nylon. La antigenicidad de estas proteínas es común a los anticuerpos para HTLV-1 y HTLV-2, lo que permite realizar la confirmación en un solo ensayo. Se considera como antígenos sin especificidad dos bandas gag (p19I/II, p24 I/II) y dos bandas env (gp46I/II, gp21I/II). Adicionalmente en la tira está incorporada una banda para cada antígeno específico de tipo HTLV-1 (gag p19-I, env gp46-I) y para HTLV-II (env gp46-II), cada tira tiene bandas de control positivo.

La membrana de nylon se colocó en una canaleta, se agregó 1000 μ L de solución a cada canaleta, luego de agitar se agregó a cada canaleta 10 μ L de muestra de suero de cada paciente, se consideran canaletas para los controles positivo y negativo. Posteriormente se selló y se incubó por 16 horas a temperatura ambiente en el agitador a una velocidad inferior a 100 rpm. Luego se lavó con 1000 μ L de solución de lavado y fue colocado en el agitador durante cinco minutos, se repitió tres veces. Una vez aspirado el contenido de cada canaleta, se agregó 1000 μ L de solución del conjugado a cada canaleta y se incubó durante 30 minutos en el agitador; se aspiró el contenido de cada canaleta y se eliminó. Se lava con 1000 μ L de solución de lavado en agitador por 5 minutos, esta operación se realizó por 3 veces. Se Colocó 1000 μ L de solución de sustrato a cada canaleta e incubar por 30 minutos en agitador, se aspiró el contenido de cada canaleta y eliminó, luego se agregó una solución de parada y se incubó por 30 minutos. Con una pinza se retiraron las tiras

sobre un papel absorbente, luego se secaron con una secadora de aire tibio por un minuto, luego las tiras son almacenadas en oscuridad.

Extracción del DNA de las células mononucleares

La extracción se realizó usando el Kit GFX-TM Genomic-Blood DNA Purification. En principio, las muestras con las células fueron descongeladas a un tiempo determinado. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 7000 rpm durante tres minutos, al pellet de las células se adicionó 400 μ L de solución de tampón lisis, luego se agitó con el vórtex por 15 segundos y se agregó 20 μ L de proteinasa K, se agitó a 11,000 rpm por 30 segundos, luego se pasó las muestras, todo el volumen a la columna, se centrifugó a 11,000 rpm por un minuto; descartado el líquido del tubo soporte, el DNA quedó atrapado en la membrana. Para el lavado se agregó 500 μ L de tampón de lisis, se centrifugó a 11,000 rpm por un minuto, se continuó con el lavado y secado, se adicionó el tampón de lavado tipo 6, se centrifugó 11,000 rpm por tres minutos, se eliminó el tubo del fondo con su contenido, la columna se colocó en un eppendor vacío limpio (microtubo libre de DNA-sa), y se adicionó 200 μ L de tampón de elución calentado a 70 °C, se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 11,000g por un minuto para recuperar el DNA genómico y almacenar a -20 °C .

Una de las fracciones fue congelada a -20 °C y la otra fracción fue cuantificada por el método de la fotometría con filtros de longitud de onda de 260, 280 a 320nm a fin de determinar la concentración del DNA y su grado de pureza. (Casseb, J comunicación personal).

Amplificación del segmento tax/rex del DNA proviral (Nested- PCR)

La amplificación del segmento tax del DNA proviral fue realizado por el método de PCR (Santos et al., 2003; Waziri et al., 2000). Se emplearon primers consensuales para el virus HTLV-1 en la primera corrida, SK44A(tax, HTLV-1, nt 7359-7378) (5'CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT 3') y SK 44B (tax, HTLV-1, nt 7517-7497) (5'GAG CCG ATA ACG CGT CCA TC 3'), en la segunda corrida, SK43A(tax, HTLV-1, nt 7375-7394) (5'GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA 3') y SK

43B(tax, HTLV-1, nt 7502-7486) (5'CCA TCG ATG GGG TCC CA 3'). Fueron realizadas con 35 ciclos a temperaturas de 94.50 y 72 °C para su desnaturalización del DNA en un termociclador en la primera fase, y con 25 ciclos para la segunda fase. Para la primera fase de amplificación, se prepararon 50 μ L de Mix, el cual está constituido por agua 29.5 μ L, tampón 10 μ L, MgCl₂ 2 μ L, DNTP 1 μ L, primer 1 μ L de SK-44A, 1 μ L de SK-44B y taq polimerasa 0.5 μ L, se usó 45 μ L del mix al cual se le incorporaran 5 μ L de DNA extraído. Para la segunda fase se preparó 50 μ L del mix, que consta de 32 μ L de agua, 10 μ L de tampón, MgCl₂ 2 μ L, DNTP 1 μ L, primer 1 μ L de SK-43A, 1 μ L de SK-43B y taq polimerasa 0.5 μ L, se usó 47.5 μ L del mix y se adicionó 2.5 μ L del producto de la primera amplificación.

PCR- B-actina

Se usa para confirmar las muestras negativas de Nested-PCR, se utilizaron los mismos componentes de PCR con B-actina Forward (10pmol) de 1 μ L y B-actina Reverse(10pmol) 1 μ L, Agua milli-Q 34.5 μ L, buffer 10X 4.2 μ L, MgCl₂(50mM) 3 μ L, dNTPs (10 μ L) 1 μ L, Taq.Pol 0.3 μ L, en las mismas condiciones de temperatura y tiempo, 95 °C/5 minutos, 40 ciclos de 94 °C a 72 °C de 30- 90 segundos, 72 °C por 10 minutos y 10 °C infinito.

Verificación de los productos de PCR en gel de agarosa al 3%

Se preparó agarosa al 3% en 100mL de TBE 1x, luego de calentarla en microondas durante 30 segundos hasta la dilución, se agregó 3 μ L de bromuro de etidio; se vertió en la cuba de electroforesis hasta solidificar y se sacó el peine para colocar las muestras en los orificios 5 μ L de muestra más loading buffer.

Análisis de poliformismos de fragmentos de restricción

El análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción (RLFP) consiste en detectar HTLV-1 y HTLV-2. El uso de nucleasas hidrolizan el DNA en secuencias específicas resultantes de la digestión, fácilmente detectable por diferencias en sus migraciones electroforéticas (Nei y Tajima, 1981). El procedimiento experimental es a partir del DNA proviral, por amplificación del

genoma de sus regiones por Nested-PCR, luego con las enzimas de restricción elegidas (TAQ 1 New England-Biolabs), se usó agua milli-Q autoclavada 10 μ L, NE buffer 3 o 4 2,0 μ L, BSA 2 μ L. TAQ 1 1 μ L. Luego se realizó la digestión a 65 °C durante una hora y 30 minutos. La resolución de los fragmentos se evidenció por electroforesis en gel de agarosa al 3% a 84V/90 minutos, se identificaron los fragmentos por tinción con bromuro de etidio, luego se determinaron las longitudes de los fragmentos.

III. Resultados

La corrida electroforética (Fig. 3) del Nested-PCR de las muestras correspondientes de pacientes con tuberculosis seronegativos a las pruebas confirmatorias de HTLV.

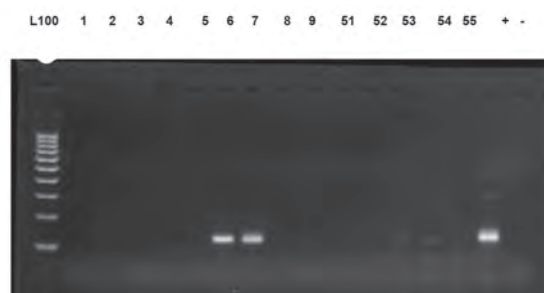


Figura 3. NESTED-PCR: Indica el peso molecular de 100 pb; del 1 al S5 son muestras problemas para HTLV; un control positivo y negativo; 6 y 7 muestras positivas al HTLV (122 pb).

Todas las muestras procesadas presentaron DNA, se desarrolló la prueba de la B-actina, para precisar si el DNA es de origen humano, y si hay en cantidad suficiente. Solo se detectaron dos muestras positivas para el HTLV de aquellos serológicamente indeterminados confirmando la presencia de HTLV en pacientes con TB serología indeterminada. En los casos que resultaron negativos podría deberse a la influencia de los tratamientos farmacológicos de primera línea (isoniazida y rifampicina) o segunda línea (fluoroquinolona, kanamicina) disminuyendo los linfocitos. Podríamos asumir que otros subtipos de HTLV están circulando debido a la globalización. El protocolo nos permitió determinar los tipos de HTLV-1 y HTLV-2, lo cual nos conduce a confirmar que en nuestro país circulan los genotipos de HTLV, predominando principalmente en pacientes con TB. Por ello, es necesario continuar con estos estudios.

En el análisis de Poliformismos de Fragmentos de Restricción, usando las enzimas de restricción se determinaron los dos tipos de HTLV como se indica en la Figura 4.

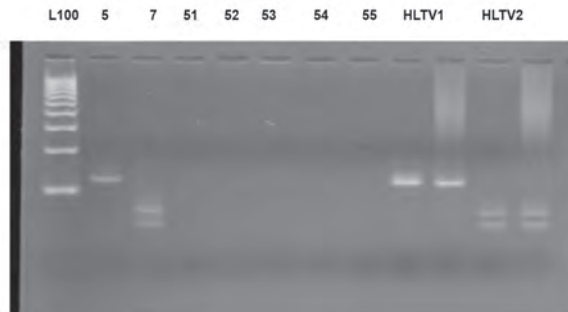


Figura 4. Enzimas de Restricción: Peso Molecular de 100 pb; 6 muestra positiva para HTLV-1; 7 muestra Positiva para HTLV-2, controles positivos para HTLV-1 y HTLV-2.

La muestra 6 es positiva para HTLV-1 con 122 pb, y la muestra 7 es positiva para HTLV-2 (53 pb, 69 pb).

IV. Discusión

De los 14 casos seroindeterminados a la detección de anticuerpos contra el HTLV en pacientes con tuberculosis, se pudo recuperar 2/14 con el protocolo de amplificación de Nested-PCR, las otras muestras continuaron indeterminadas a las pruebas de tamizaje del Elisa y Western Blot/Immunoblot (Abrams et al. 2011). En ambas pruebas se usaron proteínas a partir de lisado total de virus y algunas recombinantes para mejorar la especificidad y la sensibilidad que corresponde a HTLV-1 y HTLV-2; sin embargo, se conoce que actualmente se han descubierto HTLV-3 y HTLV-4 y esos indeterminados podrían pertenecer a los dos miembros recién descubiertos. Esta sospecha se sustenta en evidencias moleculares que indican que HTLV-3 posee algunas propiedades de HTLV-1 (podría ser que el kit es capaz de detectar HTLV-3/STLV-3) y que además existen muchos subtipos (Mauclère et al., 2011, Berini et al. 2013). Las pruebas confirmatorias deben ser capaces de identificar anticuerpos para proteína de core (gag) y de envoltura (env) del HTLV 1/2.

Las muestras son testadas en duplicado para minimizar el error técnico. Especímenes que son reactivos a cualquiera de las dos pruebas duplicadas, son considerados reactivos repetidamente. Especímenes que no son reactivos a cualquiera de las dos pruebas repetidas en duplicado son considerados no reactivos.

Los criterios para seropositividad de HTLV-I/II fueron adoptados por un grupo de investigadores del servicio de salud pública de Norteamérica en 1988. Una muestra que es reactiva repetidamente por Elisa para HTLV-I/II tiene que demostrar inmunoreactividad a la proteína p24 y para un producto de gen env (gp61/68 y/o gp46). Son considerados indeterminados "sueros reactivos indeterminados" los que no satisfacen estos criterios pero muestran inmunoreactividad a por lo menos un producto. En estos casos se usan las pruebas de inmunoblot para determinar si una muestra de suero es positivo o indeterminado. Estos estudios que involucran amplificación de provirus apoyarán en la precisión de estos criterios diagnósticos. En algunos individuos se ha presentado reactividad para p19 y para un producto del gen env (gp61/68 y/o gp46), mas sin reactividad para 24, por lo que fueron considerados infectados por el HTLV-I/II. Recientemente el avance importante en las pruebas serológicas para HTLV fue el desenvolvimiento de una proteína recombinante de env p21e que se usa en las pruebas de Elisa y Western Blot, que incrementa la sensibilidad de las pruebas y la expresión de esta proteína es observada en casi 100% de las personas infectadas.

Los estudios indican que pueden ser altamente específicas y sensibles las pruebas de tamizaje usando proteínas recombinantes para diferenciar los anticuerpos de HTLV-1 Y HTLV-2, no todas las muestras de sueros positivos a HTLV-I/II pueden ser diferenciados en HTLV-1 y HTLV-2 usando las pruebas mencionadas. Es necesario usar métodos más sofisticados, como amplificación de provirus, como es el caso que estamos estudiando o el aislamiento del virus, para diferenciar infección por HTLV-1 o HTLV-2.

Se logró optimizar las concentraciones de $MgCl_2$ y las temperaturas de aniling en concordancia a lo encontrado por Vallejo y García (1995).

El uso de la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa PCR (Nested-PCR) contribuirá con certeza el diagnóstico clínico diferencial de infecciones por HTLV-1 y HTLV-2 siendo un soporte para el aconsejamiento oportuno de personas infectadas.

Implementar la técnica de PCR propuesta para los casos de indeterminados principalmente en

bancos de sangre, siendo la principal vía de diseminación del virus HTLV-1 especialmente en productos hemoderivados. En pacientes con TB se requiere la detección del virus para determinar un tratamiento especializado durante su quimioterapia, porque los virus afectan la respuesta inmunológica. El método propuesto detecta la presencia de virus HTLV-I/II en pacientes seroindeterminados, sometidos a tratamiento quimioterápico para la tuberculosis. En nuestro país circula HTLV-1 y HTLV2 presentes en pacientes seroindeterminados, así como Berini et al. (2007) lo reportó en Argentina a partir de seroindeterminados.

Se recomienda seguir estandarizando, porque las técnicas moleculares existentes no se ajustan a estos pacientes para la detección del mayor porcentaje posible por ser sometidos a quimioterápicos. Se requiere continuar los estudios para realizar los ajustes por la probabilidad de circular otros subtipos de HTLV, y estos presentan patrones distintos de replicación (Gabet et al. 2006).

V. Conclusiones

- El estudio demostró con el protocolo de amplificación proviral la presencia de HTLV en coinfectados con tuberculosis.
- Por diferencias en sus migraciones electroforéticas se evidenció la presencia de HTLV-1 y HTLV-2, lo que confirma que está circulando en pacientes ambulatorios en tratamiento de tuberculosis, tornándose una fuente de riesgo de dispersión del virus.
- La técnica de amplificación pro viral contribuye en la definición del estatus de infección retroviral en los individuos coinfectados con tuberculosis para su tratamiento oportuno.

Agradecimientos: Al Consejo Superior de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo financiero. Un especial reconocimiento a los investigadores: Dr. Jorge Casseb, por permitir capacitarme en aspectos clínicos de HTLV por el apoyo científico y colaboración con equipos en su laboratorio de inmunovirología Instituto Medicina Tropical; al Dr. Edison Luiz Durigon por sus sugerencias, apoyo logístico y revisión de material bibliográfico. Laboratorio de Virología, Instituto de Ciencias

Biomédicas. Ambos investigadores pertenecen a la Universidad de Sao Paulo (USP).

VI. Referencias bibliográficas

Abrams, A et al. 2011 The prevalence and significance of HTLV-I/II seroindeterminate Western blot patterns. *Viruses* 3(8):1320-31.

Berini, CA et al. 2007 Human T. cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-1and-II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *Rev.J.of Medical Virology*. Vol.79: 69-73.

Berini, CA et al. 2013 HTLV-1 cosmopolitan and HTLV-2 subtype b among pregnant women of non- endemic areas of Argentina. *Sex Transm Infect*. 2013 Jun; 89 (4):333-5.

Cesaire, Retal. 1999 Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. *Transfusión*. 39: 1145-9

Gabet, AS et al. 2006 Endemic versus epidemic viral spreads display distinct patterns of HTLV-2b replication. *Virology*. Feb 5; 345(1):13-21

Gotuzzo, E, 2010 Veinte años de investigación sobre HTLV-I y sus complicaciones médicas en el Perú *Perspectivas generales*. *Acta Med. Per*. 27 (3).

García, Z et al. 2006 Detección de anticuerpos contra los virus linfotrópicos de células T tipo I/ II (HTLV I/II) como medida de seguridad sanguínea en donantes de sangre en Costa Rica. Mayo del 2002 a diciembre del 2004. *Rev Costarric Cienc Med Junio*; 27: 11-29.

Mauclere, P et al. 1997 Demographic, ethnic, and geographic differences between human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I-seropositive carriers and persons with HTLV-I Gag-indeterminate Western Blots in Central Africa. *J Infect Dis Aug*; 176(2):505-9.

Mauclere, P, et al. 2011 HTLV-2B strains, similar to those found in several Amerindian tribes, are endemic in central African Bakola Pygmies. *J Infect Dis*. May 1; 203 (9):1316-23.

Martínez-Nieto, O, et al. 2007 Seroprevalencia de anticuerpos para virus linfotrópicos humanos (HTLV I/II) en donantes de sangre de una clíni-

ca de Bogotá, Colombia. 1999-2004. Rev salud pública. Abril; 9(2): 253-261.

Mahieux, R, et al. 2000 A human T-cell lymphotropic virus type 1 gag indeterminate western blot patterns in Central Africa: relationship to Plasmodium falciparum infection. J Clin Microbiol Nov;38 (11):4049-57.

Mayta, Egma et al. 2007 Informe final CSI. Evaluación serológica y molecular de virus HTLV-1/2 en individuos atendidos en el Instituto de Medicina Tropical. Proyecto N° 071001261.

Mayta, Egma et al. 2011 Informe final CSI. Evaluación del virus linfotrópico humano (HTLV-1) en pacientes con enfermedad bacteriana y parasitaria en el IMT y Centros Hospitalarios.

Nei, M. y Tajima, F. 1981 DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. Genetics, 97: 145- 163.

Rouet, F, et al. 2001 Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. J Clin Microbiol Apr; 39 (4): 1247-53.

Sabino, EC, et al. 1999 Evaluation of the Inno-Lia HTLV-1/2. Assay for Confirmation of Human T-Cell Leukemia Virus-Reactive Sera

in Blood bank Donations. J.Clin Microbiol. 37: 1324-8.

Santos, TJT et al. 2003 Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brasil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. Braz J. Infect Dis. 7: 202-9

Teixeira Santos, TJ, et al. 2003 Western Blot seroindeterminate individuals for Human T Lymphotropic Virus 1/2 in Fortaleza (Brazil): A serological and molecular diagnostic and epidemiological Approach. Braz J Infect Dis 7(3): 202-209.

Ximena, C, et al. 2007 Patrones indeterminados de Western Blot en sueros reactivos por anticuerpos contra los virus linfotróficos de células T Tipo 1/2 (HTLV 1/2) en donates de sangre en Costa Rica. Rev. Costarricense de Ciencias Médicas • Vol. 28:11-20

Vallejo, A y García Sáiz, A 1995 Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: application to clinical specimens. J Virol Methods 51(1):9-17

Waziri, A, et al. 2000 Characterization and Sequencing of Prototypic Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) from an HTLV-1/2 Seroindeterminate Patient. J. of Virology. Vol. 74, No. 5:2178-2185