

Sección: Artículos originales

Amplificación de segmentos de ADN del virus linfotrópico humano 1 (HTLV-1) en pacientes con paraparesia espástica tropical y seropositivos asintomáticos¹.

Felipe García Vallejo, Ph.D.², Rubén Bonilla, B.Sc.³, Gerardo Gallego, B.Sc.³, María Teresa Rugeles, M.Sc.³, Isabella Borrero, M.Sc.⁴

RESUMEN

Se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para amplificar moldes de genomas provirales de 13 muestras de individuos con PET y portadores asintomáticos. El segmento amplificado de 187 pb del gen pol se observó en 7 (53.8%) de las muestras; el fragmento tax-rex de 159 pb se visualizó en 8 (61.5%) de los ADN estudiados; solamente 2 (16.6%) presentaron amplificación del LTR3' de 357 pb. Estos análisis indican que 53.8% de las muestras eran HTLV-1. Al comparar los resultados obtenidos con ELISA, Immunoblot y RCP se descubrieron 2 falsos negativos ($p = 2/13$) en la muestra. Se establecieron criterios para reevaluar ELISA y el Immunoblot como métodos diagnósticos.

Las infecciones provocadas por retrovirus y su importancia como agentes etiológicos de enfermedades del sistema nervioso central, presentan numerosos problemas de interés para clínicos, patólogos, epidemiólogos e investigadores básicos. El aislamiento y caracterización de HTLV-1 fue hecho independientemente en 1980 por Poiesz et al.¹ y Miyoshi et al.² a partir de una biopsia de un paciente con linfoma cutáneo de células T y de una línea celular obtenida de células blancas leucémicas de un individuo con leucemia de células T del adulto (ATL).

Los estudios realizados por Zaninovic et al.³ indicaron la estrecha correlación que existe entre HTLV-1 y la paraparesia espástica tropical (PET). Este desorden

neurológico también es el mismo referido en Japón como mielopatía asociada con HTLV-1 (HAM). Esta afirmación se basa en bandas oligoclonales con actividad específica contra HTLV-1 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con PET⁴, la demostración por técnicas de inmunofluorescencia de antígeno HTLV-1 en mononucleares de la sangre periférica en enfermos con PET⁴ y el hallazgo por microscopía electrónica de partículas virales semejantes al HTLV-1, en la médula espinal de jamaicanos con PET. Es notoria la alta prevalencia de anticuerpos contra el HTLV-1 en pacientes con PET y en los individuos que viven con ellos, en comparación con los controles^{5,6}. En los últimos años se han descrito numerosos casos en el Caribe, Africa, India, así como en la costa pacífica de Colombia^{3,6-8}.

Desde el punto de vista clínico, la PET ofrece un cuadro lento y gradual. Los sujetos desarrollan espasticidad y debilidades en los miembros inferiores. Los estudios iniciales la mostraron como una enfermedad endémica en individuos de raza negra que habitan en áreas tropicales, pero los estudios epidemiológicos recientes señalan la presencia de PET en caucásicos de áreas no tropicales³ y en algunos indígenas del Amazonas y de los Andes colombianos⁷.

Una característica poco usual del HTLV-1 es su elevado nivel de infección asociado con células sin virus libre demostrable serológicamente. El posible reservorio de infecciones latentes son los linfocitos T de la sangre periférica. La immortalización de las células T por HTLV-1 *in vitro* lleva a su crecimiento en ausencia de interleucina 2 (IL-2). Las células immortalizadas presentan por lo general un fenotipo "ayudador activado", que se caracteriza por la presencia de los antígenos de superficie CD₄ CD₂₅ o Tac⁸.

El HTLV-1 es un retrovirus tipo C con una estructura general semejante a los otros retrovirus animales

1. Este proyecto fue financiado con fondos de COLCIENCIAS y la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesor Titular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
3. Investigadores, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Profesora Asociada, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

conocidos. Su genoma está conformado por una región *gag* que codifica proteínas internas del virión; el gen *pol* del que se transcriben las proteínas polimerasas y el segmento *env* que contiene la información para las proteínas de la envoltura⁸. La transcriptasa reversa copia una molécula de ADN complementaria al genoma ARN, que se integra como provirus en el ADN nuclear de la célula huésped. Cada extremo del provirus posee una repetición terminal larga (RTL) que se codifica por señales del comienzo de la transcripción⁹.

Adicionalmente existen dos genes reguladores localizados en la región pX. El primero codifica por la p40/42 (tax) que participa en la transcripción viral y el otro corresponde a la proteína reguladora p27 (gkhji) que controla los niveles de ARN(m) del segmento *gag*¹⁰.

El suero de personas infectadas con HTLV-1, tanto portadores sanos como enfermos con ATL, PET y HAM, reacciona específicamente con polipéptidos virales. Los más comunes son las glicoproteínas (gp61 y gp45) codificadas por el gen *env* y p24, p19 y p15 traducidos a partir de la región *gag*^{11,12}. Sólo ha sido posible descubrir reactividad a la proteína p40/42 en la mitad de los portadores, mientras que p27 se observa sólo por rareza⁸.

Uno de los enfoques más importantes en el diagnóstico de las infecciones causadas por retrovirus tiene como base la demostración de anticuerpos contra antígenos o proteínas virales. Las pruebas que se pueden catalogar como tradicionales en este sentido son ELISA e Immunoblot. La primera se utiliza en la evaluación, mientras que la segunda se ha empleado como prueba confirmatoria^{12,13}.

La prueba ELISA, tiene por objeto descubrir la presencia de anticuerpos circulantes en el paciente. Esta prueba diagnóstica presenta altos niveles de sensibilidad y especificidad, pero como se han descrito cierto número de falsos positivos, se impone una prueba confirmatoria, el Immunoblot^{13,14}.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP)¹⁵ es un método *in vitro* que permite la amplificación específica de secuencias de ADN, metodología capaz de aumentar hasta en un millón de copias una secuencia específica de ADN, y facilitar así su análisis posterior¹⁶. La RCP es importante en el estudio de secuencias específicas de nucleótidos, tanto en el diagnóstico clínico como genético de enfermedades infecciosas y hereditarias^{16,17}.

La especificidad de la amplificación con RCP tiene

como base el empleo de oligonucleótidos cebadores ubicados en el comienzo y en el final del segmento del ADN que se va a amplificar; esos cebos orientan la síntesis de ADN por la ADN-polimerasa de **Thermus aquaticus** (Taq) a lo largo de la región ubicada en medio de ellos¹⁷.

En este artículo se informan los resultados de amplificación del ADN en sangre periférica de algunos pacientes con PET y en varias muestras del Banco de Sangre del Hospital Universitario del Valle (HUV), Cali, Colombia sometidas a RCP con cebos específicos para segmentos de los genes *pol*, *tax*-*rex* y la región LTR3' de HTLV-1.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental. Se extrajo el ADN a partir de linfocitos de sangre periférica de 8 pacientes cuyo diagnóstico clínico para PET era positivo; 5 eran seropositivos por ELISA e Immunoblot; y también en 5 muestras del Banco de Sangre del HUV que habían sido positivas para anticuerpos anti-HTLV-1 por el método de ELISA y además 3 de ellas por Immunoblot. Como controles para el análisis se tomaron al azar 7 individuos que eran seronegativos para HTLV-1 y que no habían estado antes en la región de la costa pacífica colombiana donde hay incidencia alta de HTLV-1.

Los 8 pacientes PET+ eran individuos de color, nativos de Tumaco (Nariño). Las muestras del Banco de Sangre del HUV se habían recibido para comprobar el HTLV-1 por Immunoblot. Los linfocitos de estos enfermos se separaron a partir de sangre periférica y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su estudio.

Oligonucleótidos cebadores. Para la ejecución de la RCP se emplearon 3 pares de oligonucleótidos cebadores que contienen secuencias del provirus MT2 de HTLV-1. Estos fueron: p27+ (CCCTACAATCCAACCAGCTCAG) que se localiza en la región del gen *pol* 4756 → 4774, p28- (GTGGTGAAGCTACCATCGGGTTT) que se ubica en el segmento *pol* 4943 ← 4910. Para la amplificación del segmento *tax*-*rex* se utilizaron los oligonucleótidos p5 (GAGCCGATAACGCGTCCATCG) 7516 ← 7495 y p6 (CGGATACCCAGTCTACGTGT) 7357 → 7370. Finalmente, como cebos para la amplificación de la región LTR3' se emplearon los oligonucleótidos p25 (TGACAATGACCATGAGCCCAAATATCCCC) 23 → 52 y p26 (GAGCCCCCTCCTGAACTGTCTCCACGCTTT) 380 ← 346.

Extracción del ADN de linfocitos. El ADN de los linfocitos en la sangre periférica de los 13 individuos

objeto del estudio y de los controles normales se extrajo con el método de lisis y digestión con proteinasa K, descrito por Sambrook et al¹⁶. Cada ADN por separado se precipitó en 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La determinación del grado de pureza de cada muestra se hizo mediante el cálculo de la relación A260/A280; en este estudio el valor promedio A260/A280 fue 1.6 ± 0.3 .

Reacción en RCP. La amplificación de cada uno de los segmentos del provirus HTLV-1 se efectuó mediante la técnica de RCP¹⁷; se utilizó el estuche Gen-Amp de Amersham Co (Amersham, UK).

Inicialmente se efectuaron experimentos pilotos para establecer las condiciones de mayor estabilidad y especificidad de amplificación. Todas las reacciones se efectuaron a temperaturas de 60°C para el alineamiento de los cebos que es la fase crítica para la amplificación. Todas las muestras del ADN se amplificaron según el protocolo desarrollado por Seiki et al¹⁷. Como control de la amplificación se utilizaron secuencias provirales de HTLV-1 de la línea celular MT2 (cepa japonesa). El ADN del bacteriófago 1 se incluyó como control para la reacción de la amplificación.

Electroforesis del ADN. Los segmentos de ADN generados por la amplificación con los cebos correspondientes, se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5%. Las bandas respectivas se demostraron por su fluorescencia en el rango de luz ultravioleta al emplear bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron para su análisis y determinar el tamaño molecular del segmento amplificado¹⁶.

Serología. La prueba ELISA se efectuó con reactivos comerciales [Abbott (HTLV-1), North Chicago]. La prueba de Immunoblot se realizó de acuerdo con lo descrito por Harlow & Lane¹⁸.

Análisis estadístico. Aunque la muestra analizada fue pequeña, se calcularon las cifras de discordancia teniendo como base las comparaciones de ++, +-, +- y — de pares de método. Se calculó el coeficiente Kappa (k) con el fin de comparar las contribuciones debidas al azar o a discrepancias reales de los métodos ensayados.

RESULTADOS

Amplificación de los cebos p27 y p28. Con los cebos p27 y p28, fue posible amplificar en algunos de los casos una banda de 187 pares de base (pb) que se localizaba en la región del genoma HTLV-1 entre los pb

4756-4910. De las 13 muestras, 7 (53.8%) que se consideraron como sospechosas para PET presentaron amplificación del fragmento pb 187. Con los cebos p27 y p28 también se visualizó un fragmento de tamaño similar en el ADN extraído de la línea celular MT2. En la Figura 1A se muestra el patrón electroforético obtenido. El Cuadro 1 presenta los resultados de la RCP en la región del gen pol que se amplificó entre los cebos p27 y p28. Ningún ADN de los controles presentó amplificación. En algunas muestras, además de la banda de 187 pb, se obtuvieron 2 bandas adicionales amplificadas con tamaños moleculares de 146 y 134 pb (Figura 1A).

Cuadro 1
Amplificación de Segmentos Provirales de HTLV-1 en ADN de Sangre Periférica de Pacientes con PET y Donantes del Banco de Sangre del HUV en Cali.

Cebos	Segmento	Gen	Tamaño del segmento amplificado en pb	RCP*		%
				+	-	
p27	4756-47774	pol	187	7	6	53.8
p28	4943-4910					
p5	7516-7495	tax-rex	159	8	5	61.5
p6	7357-7370					
p25	23-52	LTR 3'	357	2	11	8.3
p26	380-346					

* Para determinar la presencia del provirus se emplea como criterio la visualización de la banda de ADN de tamaño correspondiente, por medio de electroforesis en gel de agarosa.

Amplificación de los cebos p5 y p6. Los oligonucleótidos p5 y p6 permitieron amplificar un segmento de la región tax-rex que iba de 7357 a 7495. La banda cuyo tamaño molecular correspondía a 159 pb se descubrió en 8 (61.5%) de las 13 muestras en estudio. La misma banda se observó en el ADN de la línea celular MT2 (Figura 1B). El ADN de los controles seronegativos no amplificó el segmento respectivo (Cuadro 1).

Amplificación de los cebos p25 y p26. Los oligonucleótidos p25 y p26 sirvieron para amplificar una porción de 357 pb del LTR3' en el provirus respectivo. Los resultados sólo permitieron determinar amplificación en algunas de las muestras; en todos los experimentos en el ADN de la línea celular MT2 se observó la banda de 357 pb esperada. El experimento se repitió 2 veces y se obtuvieron resultados reproducibles. La Figura 1C muestra la electroforesis correspondiente a uno de los experimentos hechos. El

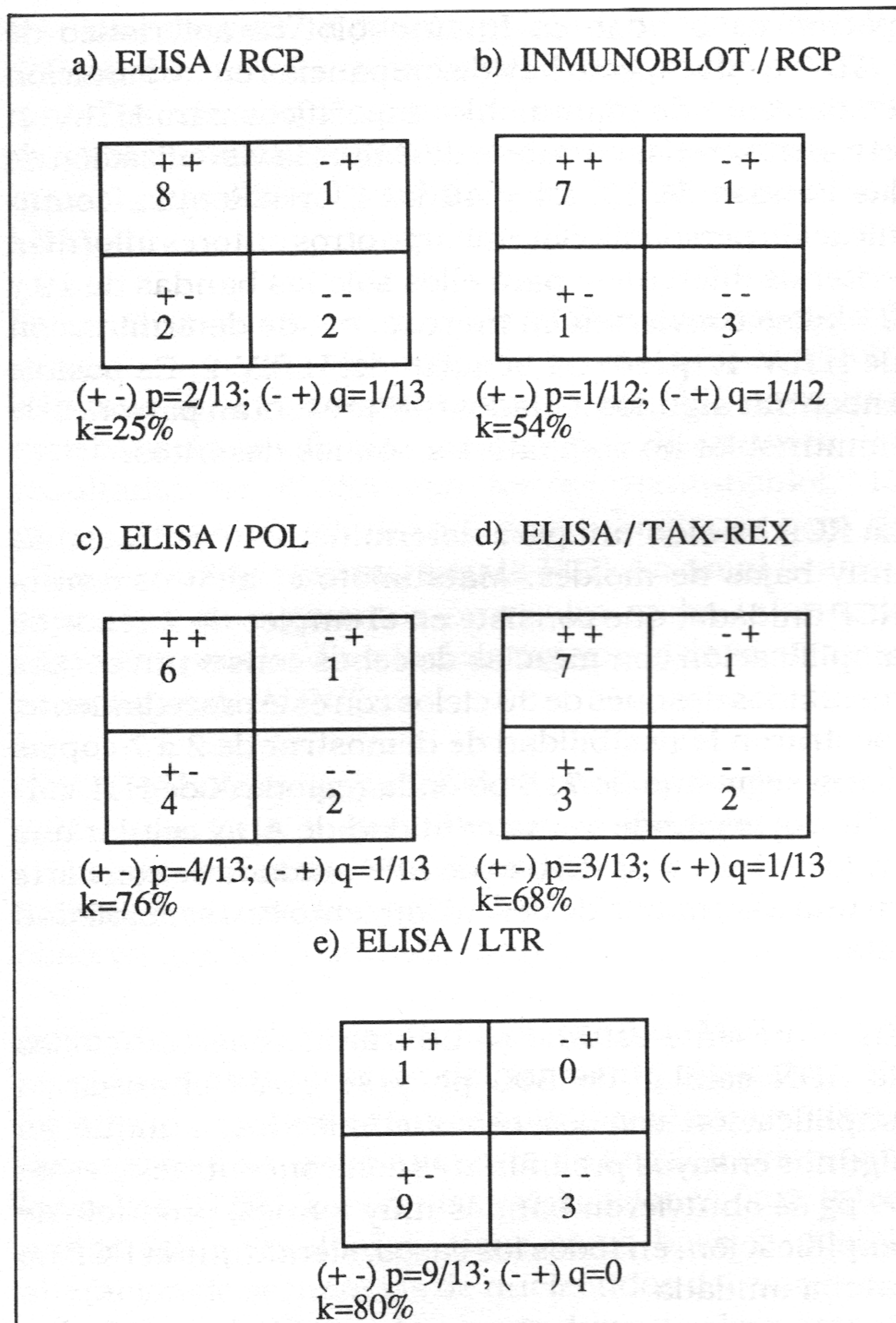


Figura 1. RCP mediante cebos para el gen pol, la región tax-rex y el LTR3' del virus HTLV-1 a partir de ADN de linfocitos de sangre periférica. (A) Amplificación con los cebos p27 y p28 específica para el segmento de 187 pb del gen pol. (B) Amplificación con los cebos p5 y p6 de la región tax-rex de 159 pb. (C) Amplificación con p25 y p26 del LTR3' de HTLV-1. La electroforesis se llevó a cabo en un gel al 2.5% de agarosa y las bandas se visualizaron por fluorescencia con bromuro de etidio sobre luz ultravioleta de 260 nm. El marcador de tamaño molecular empleado fue "1 kb leader"/BRL (Bethesda). En la mayoría de las muestras y los controles se efectuaron 30 ciclos de amplificación.

ADN de los controles no presentó señales de amplificación.

Evaluación de los tres métodos de estudio. El Cuadro 2 resume los resultados en las pruebas ELISA, Immunoblot y RCP, con los cebos que se emplearon para analizar las muestras. Aunque la muestra es pequeña, se consideró la factibilidad de obtener resultados con respecto a las bondades de cada una de las técnicas seguidas en este trabajo.

Se calculó la probabilidad de discordancia entre pares de métodos. La probabilidad que se vio permite valorar

Cuadro 2
Resultados de Comparar la RCP con las Pruebas ELISA e Immunoblot.

Caso	Dxo PET	ELISA ^a	Immuno- blot	pol ^b	tax-rex ^c	LTR3' ^c	Positividad por RCP
1	+	+	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	-	+
4	+	+	+	+	+	-	+
5	-	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	+
7	-	+	-	-	-	-	-
8	-	+	?	-	+	+	+
9	-	+	+	+	-	-	+
10	-	+	+	-	+	+	+
11	+	-	-	-	-	-	-
12	+	-	-	+	+	-	+
13	+	-	-	-	-	-	-

^a ELISA de Abbott.

^b Se utilizó el par de cebos p27, p28 específicos para HTLV-1.

^c Los otros dos pares de cebos sólo especifican HTLV-1, II de HIV.

cuál de los pares es el sistema más confiable. La Figura 2 presenta las comparaciones de los métodos ELISA, Immunoblot y RCP. Cuando se confrontó ELISA con RCP, fue posible calcular la probabilidad de falsos positivos en ELISA como p=2/13 con k=25%. Sin embargo la probabilidad de falsos negativos tanto con ELISA como con Immunoblot fue 1/13 y 1/13, respectivamente, con k= 54% (Figuras 2 a, b).

La comparación de ELISA con el resultado de las amplificaciones en RCP para cada par de oligonucleótidos específicos, mostró probabilidades variables según el cebo (Figuras 2 c, d, e).

DISCUSION

Uno de los problemas más serios en la demostración diagnóstica de los retrovirus humanos, es la sensibilidad de la prueba que se va a utilizar. En este sentido la RCP cumple un requisito importante, pues es una metodología de amplificación de un molde proviral inicial. En este trabajo se sometieron a amplificación 3 regiones distintas como un criterio para poder filtrar los resultados y llegar a una determinación final del tipo de provirus HTLV.

De acuerdo con el criterio anterior, el uso de cebos que amplificaron el segmento de 187 pb en la región pol, se convirtió en una herramienta para determinar el número de provirus HTLV-1 en las muestras. Los cebos p27 y p28 se diseñaron como cebos HTLV-1

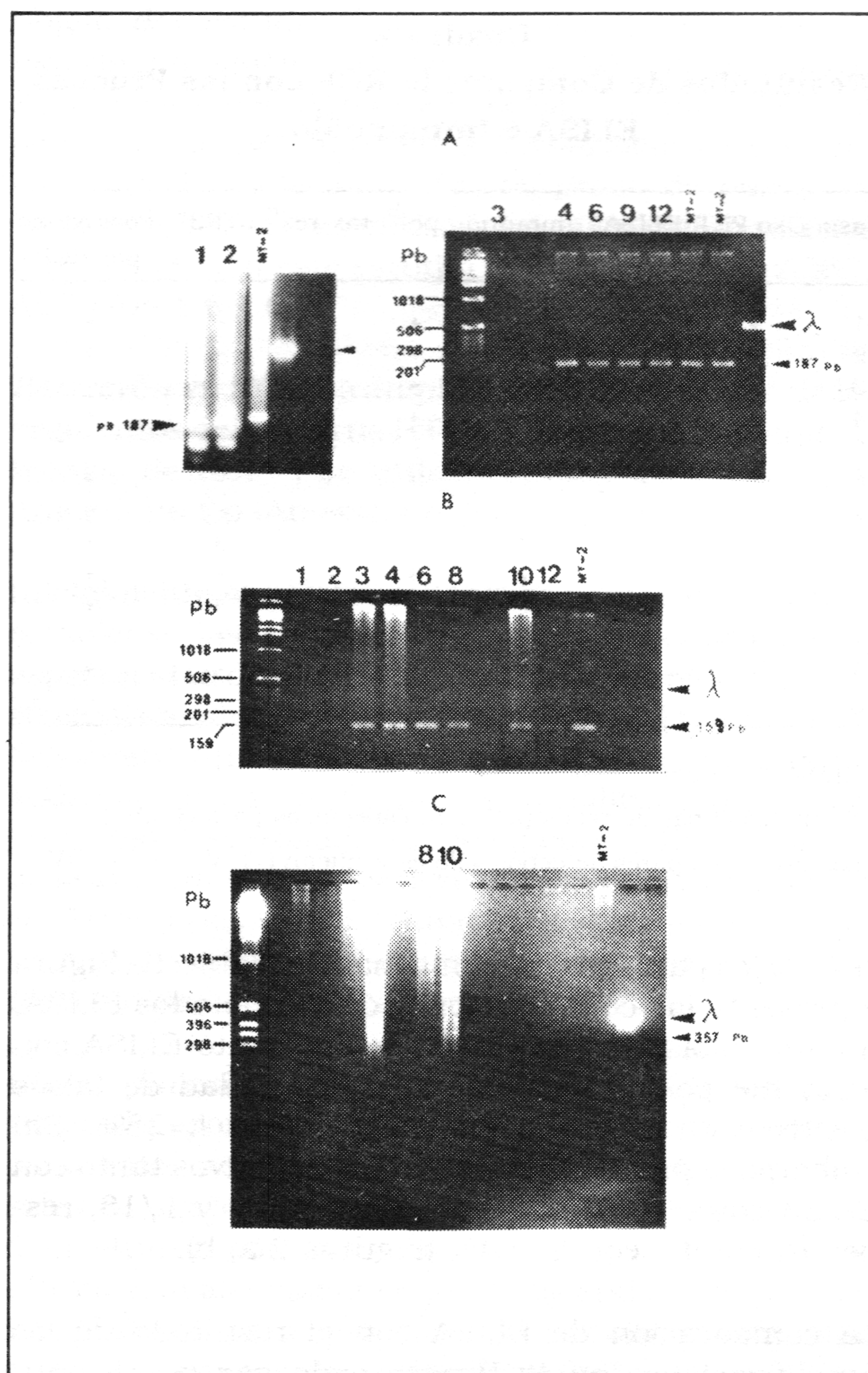


Figura 2. Comparación de los distintos métodos diagnósticos para demostrar HTLV-1 (p= frecuencia de +; q= frecuencia de -+).

específicos. Los resultados en este trabajo coinciden con los obtenidos por diagnóstico clínico; todas las 7 muestras amplificadas corresponden a pacientes con PET.

De otra parte, la concordancia entre las 2 pruebas indirectas empleadas (ELISA e Immunoblot), y RCP fue variable aunque siempre la probabilidad de discordancia era menor en el caso de RCP^{19,20}. Los resultados de las amplificaciones con cebos de las regiones tax-rex, permitieron demostrar 4 aislamientos que habían sido negativos para pol (Cuadro 2); en estos casos no hubo amplificación con los cebos específicos de HTLV-1 (p27 y p28). Estos resultados llevan a la conclusión general que tales hallazgos no corresponden a HTLV-1. Es interesante destacar que todos los aislamientos ensayados presentaron un

patrón de bandas en Immunoblot característico de HTLV-1. Al respecto hay discrepancias en la definición de patrones de Immunoblot específicos para HTLV-1; el criterio en el laboratorio de Cali es la visualización de las bandas de 15, 24 y 46 kd (Boris Renjifo, comunicación personal). Sin embargo otros autores informan criterios diferentes; para ellos sólo las bandas de 19 y 24 kd se convierten en marcadores de determinación de HTLV-1, que lo diferencian del HTLV-2. Es posible encontrar algunos aislados que presentan patrones de Immunoblot no compatibles con los descritos.

La RCP ha sido útil para determinar concentraciones muy bajas de moldes. Matsumoto et al.²¹ usaron la RCP anidada, que consiste en el empleo de 2 cebos de amplificación con mezclas de cebos consecutivos. Los resultados después de 30 ciclos con este procedimiento, mostraron la posibilidad de demostrar de 2 a 7 copias de un segmento de 216 pb en la región pX de HTLV-1. Esto corresponde a una cantidad de ADN celular que varía de 1.6 a 5 pg. El uso de RPC anidada se convierte en una alternativa de descubrimiento con sensibilidad alta.

En el presente estudio se utilizaron concentraciones de ADN celular de 300 pg y se pudo observar la amplificación con los cebos empleados, aunque en algunos ensayos preliminares con concentraciones de 50 pg se obtuvieron bandas muy tenues, producto de amplificación, en todos los casos, siendo que la RCP no estaba anidada.

Los resultados en este trabajo, se pueden comparar con los de Greenberg et al.²², quienes estudiaron 21 pacientes con esclerosis múltiple de tipo progresivo y cuyo ADN se amplificó por RCP mediante cebos para los segmentos LTR3', gag, pol y env; de 29% de los individuos que presentaron amplificación del segmento pol, solamente 6 amplificaron frecuencias del gen env pero no las regiones gag ni LTR3'. Los resultados de esos autores²² y los del presente trabajo muestran la presencia de segmentos retrovirales de ADN en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, donde el HTLV-1 sería el principal agente etiológico.

Otro de los aspectos importantes de la RCP como prueba potencialmente diagnóstica es el grado de especificidad. En este sentido 3 enfermos cuyos diagnósticos clínicos eran PET+ pero con resultados negativos en ELISA e Immunoblot se probaron por la RCP. La amplificación de los segmentos pol y tax-rex en uno de ellos, puso de manifiesto la presencia del provirus correspondiente; además, la amplificación

con los cebos p27 y p28 permitió identificar el HTLV-1. Este resultado es importante, pues permite postular que el uso de la RCP ayudaría a resolver los problemas de especificidad y sensibilidad que presentaron las otras 2 pruebas en la definición de las infecciones con HTLV-1.

Del análisis comparativo de la RCP (con cebos para el gen pol y la región tax-rex), con los métodos de ELISA e Immunoblot es posible concluir que RCP sería una prueba más confiable, en general. Si se unen los resultados de ELISA con los de Immunoblot, 10 muestras se caracterizaron como positivas, pero de ellas 4 eran discrepantes en la RCP. La amplificación específica de segmentos provirales se ha informado como una prueba directa de la presencia de secuencias homólogas de ADN²⁰.

Con base en este argumento se puede postular que la RCP sería una mejor alternativa diagnóstica. Sin embargo, cuando se consideran los datos de amplificación de la región de 357 pb del LTR3', se observa que son contradictorios.

Además del ADN de la línea celular MT2, sólo 2 mostraron amplificación del segmento respectivo. En los otros 11 casos a pesar de amplificar tanto pol como tax-rex, se determinó ausencia de amplificación para los cebos LTR3'. Una de las explicaciones para interpretar estos resultados, tiene como base la posible alteración de secuencias de nucleótidos del extremo 3' del ADN viral que puede ocurrir durante el proceso de integración al genoma de la célula huésped. De lo anterior puede resultar una disminución del grado de homología entre la región LTR3' y el correspondiente cebo, en este caso el p25. El efecto es la disminución de la temperatura de fusión, que aumenta la probabilidad de no apareamiento. Dentro de las condiciones establecidas para llevar a cabo la reacción de amplificación en este trabajo, se consideraba una homología de 100% entre el cebo p25 y el LTR3' del provirus HTLV-1 contenido en cada muestra pol y/o tax-rex positiva.

Un hecho significativo que contrasta con los resultados en el presente trabajo, es que en enfermos con esclerosis múltiple de tipo progresivo, no ha sido posible amplificar mediante RCP²² con los cebos SG160 (51—> 74) y SG161 (768 <— 745) el correspondiente LTR3' (0/21). Sin embargo, también se han observado reacciones positivas en sujetos con PET que se incluyeron en el estudio de Greenberg et al.²²

Los datos de Cali son contradictorios en apariencia con

los descritos, pero apuntan al hecho de las modificaciones no predecibles en el LTR3' durante los eventos de transcripción reversa o de integración del provirus al genoma de la célula huésped.

Recientemente Ajaykumar et al.²³ han presentado evidencias experimentales que muestran el retiro de nucleótidos del terminal 3' del LTR en el virus de la mieloblastosis aviar. La proteína IN del virus fue capaz de remover un conjunto específico de nucleótidos del terminal 3' del extremo romo del LTR, esto llevó a un estado de cadena única parcial del ADN viral *in vivo*. La secuencia removida correspondía al orden TTT/AAA en la unión del círculo de un LTR-LTR que se había clonado antes en un plásmido²³. Este resultado puede emplearse como apoyo al hecho que mediante este mecanismo y durante la integración se pueda generar la pérdida de nucleótidos del extremo LTR3'; o aun de cambio de secuencias de nucleótidos LTR3' durante el momento de la integración.

A pesar de que los argumentos expuestos podrían explicar la ausencia de amplificación por descenso del grado de homología entre el cebo p25 que tiene secuencia AAATATA y el LTR3' del provirus HTLV-1 en los casos negativos pero positivos para pol y tax-rex, es necesario confirmar esta hipótesis mediante experimentación directa.

En este trabajo se establecieron las condiciones para efectuar la amplificación de muestras de sangre de personas con PET o donantes de sangre asintomáticos como un criterio fino para determinar la presencia del agente causal. En 7 de las muestras se evidenció amplificación del segmento pol exclusivo del HTLV-1. Este resultado es significativo, pues la amplificación del segmento de 154 pb del gen pol con los cebos p27 y p28 hace que sólo los provirus HTLV-1 se puedan amplificar en esta región. Así, pues, la RCP como método de discriminación del HTLV-1 y HTLV-2 es mucho más confiable que el mismo Immunoblot^{12,20}.

Además, se determinó que en 4 de las muestras sólo se amplificó el segmento tax-rex. La RCP podrá ser una estrategia muy segura para poder tener estimativos de portadores sanos. En este sentido, en la muestra analizada fue posible demostrar 2 falsos negativos, hecho que destaca el empleo de RCP. El riesgo de contagio de un falso negativo es alto y se debe minimizar en las pruebas diagnósticas que se usan en el laboratorio clínico. El grado de diagnóstico de falsos negativos determina la utilidad de las pruebas ensayadas en ese estudio. El trabajo permitió establecer que la frecuencia de falsos negativos al utilizar la RCP como prueba de

oro, fue de 2/13, dato valioso, pues postula la necesidad de revisar los métodos ELISA e Immunoblot como pruebas diagnósticas confiables y de rutina.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor César Arango por proporcionar parte del material de HTLV-1 del estudio de Tumaco para la extracción del ADN de linfocitos. Al doctor Sócrates Herrera por facilitar el uso del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa. Al doctor Boris Renjifo por el suministro de los oligonucleótidos cebos empleados en este trabajo.

SUMMARY

To amplify proviral genomes from DNA obtained from 13 PET and asymptomatic carriers, polimerase chain reaction (PCR) was used. A 187 bp segment amplified from the pol gen, was observed in 7 (53.8%) of the samples. A 159 bp tax-rex fragment was visualized in 8 (61.5%) of DNA; only 2 (16.6%) of the samples amplified the 357 bp 3'LTR. The analysis showed a 53.8% of HTLV-1 provirus present in the sample. When compared ELISA and Immunoblot to the results obtained using PCR, 2 false negatives were detected ($p=2/13$). Criteria to reevaluate ELISA and Immunoblot as diagnostic alternatives were stated.

REFERENCIAS

1. Poiesz, BJ, Ruscetti, FW, Gazdar, AF et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 11: 7415-7419.
2. Miyoshi, I, Kubonishi, I, Sumida, M et al. A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann*, 1980, 71: 155-156.
3. Zaninovic, V, Biojó, R & Barreto, P. Paraparesia espástica del Pacífico. *Colombia Med*, 1981, 12: 111-117.
4. Sodroski, JG, Rose, CA & Haseltine, WA. Trans-acting transcriptional activation of the LTR of human T-lymphotropic virus. *Science*, 1984, 225: 381-385.
5. Robson, AB & Martin, MA. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell*, 1985, 40: 447-480.
6. Zaninovic, V, Biojó, R, Arango, C et al. El virus HTLV-1, como

posible causa de la paraparesia espástica del Pacífico. *Colombia Med*, 1986, 17: 2-8.

7. Zamora, T, Zaninovic, V, Kajiwar, M et al. Antibody to HTLV-1 in indigenous inhabitants of the Andes and Amazon regions in Colombia. *Jpn J Cancer Res*, 1990, 81: 715-719.
8. Muller, N. Epidemiology of HTLV-1 infection. *Cytogenet Cell Genet*, 1991, 2: 37-52.
9. Seiki, M, Hattori, S, Hirayama, Y et al. Human T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrate in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 80: 3618-3622.
10. Inoue, J, Yosshida, M & Seiki, M. Transcriptional (p40x) and posttranscriptional (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 3653-3657.
11. Schneider, J, Yamamoto, N, Hinuma, Y & Hunsman, G. Sera from adult T-cell leukemia patients react with envelope and cores polypeptides of adult T-cell leukemia virus. *Virology*, 1984, 132: 1-11.
12. Wiktor, SZ, Alexander, S, Shaw, G et al. Distinguishing between HTLV-1 and HTLV-2 by western blot. *Lancet*, 1990, 335: 1533.
13. Paul, WE. *Fundamental immunology*. Pp. 10-50. Raven Press, New York, 1989.
14. Stites, P, Daniel, D & Stobo, J. *Basic and clinical immunology*. Pp. 317-355. Lang Medical Publication, Norwalk, 1982.
15. Bell, J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today*, 1989, 10: 1-7.
16. Sambrook, J, Fritsch, EF & Maniatis, T. Molecular cloning. Pp. 350-365. *In A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed., Cold Spring Harbor, 1989.
17. Seiki, RM & Erlich, HA. Analysis of enzymatically amplified B-globin and HLA-DQ with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 1986, 324: 16-166.
18. Harlow, E & Lane, D. Antibodies. Pp. 471-510. *In A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 1988.
19. Baghavathi, S, Erlich, R, Kula, W et al. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus type 1 and antigenic spinal fluid and blood of patients with chronic progressive myelopathy. *N Engl J Med*, 1989, 318: 1141-1147.
20. Reddy, EP, Sandberg-Wolheim, R, Mettus, PE et al. Amplification and molecular cloning of HTLV-1 sequences from DNA of multiple sclerosis patients. *Science*, 1989, 243: 521-533.
21. Matsumoto, C, Mitsunaga, S, Oguchi, T et al. Detection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus in infected cell line and peripheral mononuclear cells of blood donors by nested polymerase chain reaction method. *J Virol*, 1990, 64: 5290-5294.
22. Greenberg, SJ, Erlich, G, Abbott, M et al. Detection of sequences homologous to human retroviral DNA in multiple sclerosis by gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2878-2882.
23. Ajaykumar, CV, Fitzgerald, M & Grandenett, D. Removal 3'-OH-terminal nucleotide from blunt-ended long terminal repeat termini by the avian retrovirus integration protein. *J Virol*, 1990, 64: 5656-5659.

Las artes finales se imprimieron gracias a la
colaboración del Decanato de la Facultad de Salud,
Universidad del Valle, Cali, Colombia.