

Estudio de la seroprevalencia de la infección por los virus linfotrópicos humanos (HTLV) I y II en poblaciones del departamento de Córdoba, Colombia

Milton Quintana, M.Sc.¹, Julio Villalobos, M.D.², Martha C. Domínguez, M.Sc.³, Oscar Tamayo, M.Sc.⁴, Felipe García-Vallejo, Ph.D.⁵

RESUMEN

Introducción: Se determinó la seroprevalencia de los virus linfotrópicos humanos tipos I y II (HTLV-I y II) en varios municipios del Departamento de Córdoba.

Materiales y métodos: Se analizaron 962 muestras de suero mediante la prueba de ELISA y de Western blot confirmatorio. Se analizaron genéticamente 5 aislamientos virales por RFLP y secuenciación de la región LTR.

Resultados: Se confirmaron 20 aislamientos como HTLV-I y uno como HTLV-II. La seroprevalencia de la infección por el HTLV-I en la muestra obtenida del departamento de Córdoba fue 2.1% (20/962), y para el HTLV-II 0.1% (1/962). Mediante análisis genéticos se determinó que tres correspondieron al subtipo africano b y dos el cosmopolita a.

Conclusión: Este es el primer registro de la infección tanto por HTLV-I como por HTLV-II informado para el departamento de Córdoba en Colombia..

Palabras clave: HTLV-I. HTLV-II. Epidemiología. Subtipos moleculares.

El grupo de los virus linfotrópicos humanos (HTLV) tiene dos miembros bien descritos, los tipo I y II. El HTLV-I fue el primer retrovirus patogénico que se identificó en humanos aislado de un paciente con linfoma cutáneo^{1,2}. Luego, en 1982, se aisló el HTLV-II de un tipo de leucemia rara, conocida con el nombre de leucemia de células pilosas³. En la actualidad el HTLV-I se encuentra asociado con un gran número de desórdenes clínicos. Sin embargo, la leucemia de las células T del adulto (ATL)⁴⁻⁶ y la paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada con el HTLV-I (PET/HAM)⁷⁻⁹, son las asociaciones epidemiológicas mejor documentadas.

Tanto la infección por el HTLV-I como por el HTLV-II es endémica en varias áreas geográficas del mundo,

incluyendo el suroeste de Japón^{10,11} y la cuenca del Caribe^{12,13}; en América del Sur en regiones como Chile¹⁴, Brasil¹⁵ y Colombia^{16,17} entre otras. También se ha informado en África Occidental^{18,19} y Central^{20,21}, las Islas Seychelles, Papua Nueva Guinea e Islas Solomon²²⁻²⁵, Australia²⁶, Taiwán²⁷ e India²⁸. Recientemente se han documentado nuevos casos de la infección en países como China²⁹, EEUU³⁰, Inglaterra³¹, Argentina³² y en zonas del Medio Oriente como Israel³³, Irán³⁴ y Kuwait³⁵. En todos los análisis epidemiológicos realizados se puede ver que el patrón de distribución de la infección por el HTLV-I es amplio, destacándose zonas endémicas en diferentes partes mundo.

La transmisión del HTLV-I está estrechamente asociada con la exposición de células blanco al virus. Se ha

documentado en varios trabajos^{36,37} que una vía importante de transmisión ocurre de madre a hijo a través de linfocitos infectados con el virus presente en la leche materna; ésta es una característica propia de áreas endémicas para la infección. La transmisión sexual es también un factor importante, con un mayor riesgo de transmisión de hombre a mujer a través de células infectadas presentes en las secreciones genitales^{38,39}. La fuerte agregación familiar de la infección con este virus, ha sugerido que las dos vías anteriores contribuyen a mantener el estado endémico de la infección. Sin embargo, la transfusión sanguínea y el intercambio de agujas infectadas con el virus (drogadiclos intravenosos, tatuajes, etc.) se asocian con brotes epidémicos en algunas áreas urbanas de los Estados Unidos de América y Europa.

Los métodos, como el análisis del patrón de restricción de los fragmentos amplificados por PCR (RFLP) y la secuenciación de segmentos del ADN proviral, son útiles en el conocimiento de la variación genética y en el comportamiento de la infección por el virus^{40,41}.

1. Director de Investigaciones, Facultad de Medicina, Corporación Universitaria del Sinú, Montería.
 2. Profesor Titular, Facultad de Medicina, Corporación Universitaria del Sinú, Montería.
 3. Investigadora Asociada, Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Aspirante a Doctora en Ciencias Biomédicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.
 4. Profesor Asistente, Facultad de Medicina, Universidad Santiago de Cali, Cali.
 5. Profesor Titular y Director del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali.
- Recibido para publicación septiembre 1, 2003 Aprobado para publicación febrero 6, 2004

Mediante análisis de RFLP en la región 3'LTR y de secuenciación de la región env se han discriminado genéticamente varios subtipos del HTLV-I. El estudio detallado de la distribución geográfica de los distintos subtipos del virus, permite obtener importantes conclusiones en relación, no sólo con la epidemiología molecular de la infección viral sino con el esclarecimiento de los mecanismos evolutivos de los virus en áreas endémicas para la infección por el virus.

En el presente trabajo se efectuó un estudio poblacional para determinar la seroprevalencia de la infección por HTLV-I y II en poblaciones del departamento de Córdoba. Los resultados obtenidos permiten analizar el comportamiento epidemiológico de la infección por estos dos retrovirus humanos en esta región del Caribe colombiano. Además se obtuvieron datos moleculares sobre los subtipos virales circulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada. Durante el período junio, 1998 a enero, 2000 se recolectaron 962 muestras de suero de personas de diferentes localidades de las zonas costaneras del departamento de Córdoba. El tamaño muestral apropiado se calculó con base en el programa Epi Info versión 6.0. Los sueros provenían de 298 hombres y 664 mujeres con edades que variaron entre 17 y 70 años (mediana=28 años) obtenidos de voluntarios que acudieron mediante perifoneo, a los puestos de salud y hospitales de cada uno de los municipios incluidos en el estudio. Del total de muestras, 420 se tomaron en Montería (300 mujeres y 120 hombres), 168 en San Antero (110 mujeres y 58 hombres), 127 en Cereté (81 mujeres y 46 hombres), 112 en San Pelayo (79 mujeres y 33 hombres), 69 en Moñitos (48 mujeres y 21 hombres), 42 en San Ber-

nardo del Viento (32 mujeres y 10 hombre), 16 en Lórica (9 mujeres y 7 hombres), 5 en Sahagún (3 mujeres y 2 hombres); 2 en Cotorra (2 hombres) y una proveniente de Coveñas (1 hombre) en el departamento de Sucre. A cada participante incluido en el estudio se le informó previamente los objetivos y firmaba su consentimiento para participar voluntariamente en él.

Obtención de las muestras de sangre. A cada una de las personas que voluntariamente aceptaron participar en este estudio se le tomó por venopunción, una muestra de 10 ml de sangre total. Una vez obtenido el suero se almacenó a -20° C hasta su utilización. De otra parte las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se obtuvieron por centrifugación en gradientes de Histopaque y luego se almacenaron en solución de buffer salino de fosfato (PBS) pH 7.0 en 50% de dimetil sulfoxido (DMSO), a -196° C en nitrógeno líquido.

Pruebas serológicas. Cada una de las muestras de suero se sometió a una prueba de micro ELISA utilizando el estuche ELISA Murex HTLV I + II (Murex Biotech Limited, Dartford, UK). La ejecución de la prueba se efectuó siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Seroconfirmación de la infección por HTLV-I o II. Las muestras de suero que fueron reactivas por la prueba de tamizado se sometieron a la prueba confirmatoria de Western blot. Para esto se utilizó el estuche Inmunblot HTLV blot 2.4 (Genelabs® Diagnostics Pte Ltd. Singapore Science Park, Singapore). La prueba de Western blot permite realizar una discriminación entre la infección por HTLV-I y de HTLV-II porque emplea dos proteínas recombinantes: la rpg46.1 confirma la infección por HTLV-I mientras que la rpg46.2 lo hace para HTLV-II. El criterio de confirmación para HTLV-I in-

cluyó reactividad para las proteínas de GAG (p24 ó p19) y ENV (GD21 y rpg46.1). Para la confirmación de la infección por HTLV-II se utilizó como criterio la reactividad a GAG (p24 con o sin p19) y ENV (rpg46.2 y GD21). Los criterios antes descritos fueron aplicados a todas las muestras reactivas por las pruebas de tamizado.

La seroprevalencia de HTLV-I y II en la muestra se calculó como el cociente entre el número de individuos seropositivos para cada uno de los virus y el número total de muestras analizadas.

Protocolos moleculares. Las células mononucleares de sangre periférica se lisaron por tratamiento con dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%, NaCl 1M y proteinasa K (20 mg/ml) incubando la preparación toda la noche a 56° C. El ADN celular se extrajo empleando protocolos modificados por el Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Universidad del Valle^{42,43}. La concentración y el grado de pureza se determinó por espectrofotometría, la lectura se efectuó a 260/280 nm. Para la extracción del ADN de cada una de las muestras se tomaron precauciones estrictas con el fin de evitar contaminación (la extracción del ADN se efectuó en grupos de 4 muestras y en un lugar diferente al sitio de amplificación).

Amplificación por PCR del ADN proviral del HTLV-I. Primero se efectuó una reconfirmación por PCR de las muestras HTLV-I evaluadas serológicamente amplificando un fragmento de 186 pb del gen Pol con cebadores específicos. De igual forma se hizo la reconfirmación de la infección por HTLV-II empleando cebadores específicos del gen en la envoltura⁴³.

Para hacer el análisis genético por RFLP de los aislados virales se realizó un PCR en un segmento de 701 pb de la región 5'LTR del ADN proviral extraído de linfocitos de sangre periférica. Se

utilizaron oligonucleótidos cebadores (LTR1 (+) (37-738) LTR1 (ACCATG AGCCCAAATATCCCC), LTR2 (AA TTTCTCTCCTGAGAGTGCTATA). El oligonucleótido cebador LTR3 (CAT AAGCTCAGACCTCC) se empleó como sonda en experimentos de hibridación en Southern. Las muestras de ADN se amplificaron en un termociclador (Perkin-Elmer Cetus, modelo 4800); se efectuó un paso de desnaturalización previo por 5 minutos a 94° C, seguidos por 35 ciclos conformados por un paso de desnaturalización por un minuto a 94° C, uno de alineamiento a 50° C y un paso final de extensión a 72° C por dos minutos; finalmente, se efectuó un ciclo adicional de extensión a 72° C por 10 minutos, tiempo necesario para permitir que la Taq polimerasa complete la polimerización de los fragmentos incompletos. Se emplearon 10 microlitros de cada producto de PCR para visualizar las bandas amplificadas de acuerdo con su tamaño molecular, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El segmento de 701 pb de la región LTR se digirió con las enzimas Apa I y Nde I (GIBCO, BRL), que definen los perfiles de restricción para el subtipo I, Mae III y Dra I (Promega) para el subtipo cosmopolita y Sac I (GIBCO BRL) para el subtipo africano occidental^{40,41}. Los fragmentos resultantes se separaron de acuerdo con el tamaño molecular empleando análisis electroforético en un gel de agarosa del 3% siguiendo la metodología de Sambrook *et al.*⁴⁴ Los fragmentos producidos por las digestiones de las diferentes endonucleasas de restricción previamente descritas, se analizaron mediante la observación del patrón de bandas generadas y comparadas con el prototipo MT-2. Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó la prueba de Fisher para establecer la relación entre el sexo y el estado clínico de los pacientes con los subtipos

encontrados en este estudio.

Protocolos de clonación y secuenciación de ácidos nucleicos. El fragmento de 701 bp de la región LTR obtenido de cada uno de los aislados del HTLV-I se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa del 2%. Luego se empleó el estuche QiaGen® de elución de bandas siguiendo los procedimientos recomendados por los fabricantes. Cada uno de los fragmentos eluidos se clonó en el sitio Hind III del vector pCR2.1 (Invitrogen®). Los clones recombinantes se seleccionaron de acuerdo con lo descrito por Sambrook *et al.*⁴⁴

Para la secuenciación de la región LTR se escogieron tres recombinantes de cinco aislados del HTLV-I (002-Mont, 022-Mont, 047-Mont, 010-Mont y 046-Mont), se utilizó el estuche *Big Dye Terminator* (QiaGen®), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. La secuenciación se realizó empleando la metodología de secuenciación cíclica utilizando un secuenciador automático AbiPrism serie 3700.

Análisis filogenético. Las secuencias nucleotídicas de la región LTR de cinco aislados de la población de Moñitos y de otras previamente consignadas en el GeneBank (Cuadro 1) se alinearon usando el programa Clustal W⁴⁵. Para el análisis filogenético molecular de cada una de las secuencias LTR, se emplearon tres algoritmos: la evolución mínima distancia-base (ME), la probabilidad máxima (ML), y la parsimonia máxima (MP)⁴⁶. Cada árbol se evaluó estadísticamente mediante la prueba de *Bootstrap* empleando 500 repeticiones.

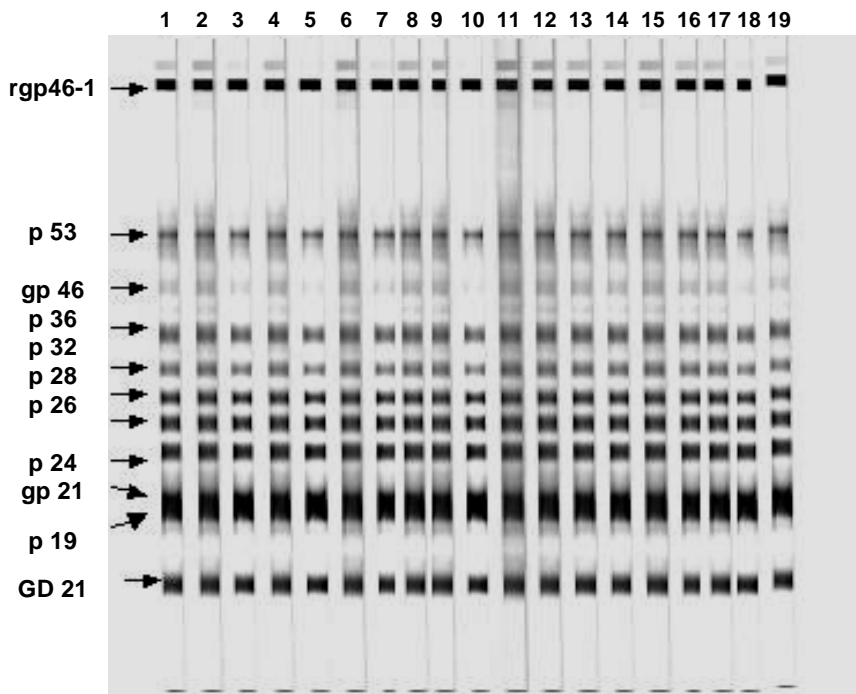
Caracterización del ADN mitocondrial. Con el fin de definir el origen étnico de los individuos portadores del HTLV-I en el departamento de Córdoba, se determinaron los haplotipos mitocondriales, mediante un análisis de polimorfismo del tamaño de fragmen-

tos de restricción (RFLP), utilizando para ello los oligonucleótidos cebadores descritos por Torroni *et al.*⁴⁷ Para la diferenciación de los haplotipos se utilizaron 14 enzimas de restricción (AluI, AvaII, BamHI, DdeI, HaeII, HaeIII, HhaI, HincII, HinfI, HpaI, MspI, MboI, RsaI y TaqI). De acuerdo con la combinación de patrones de restricción con enzimas marcadoras, cada individuo incluido en este estudio, se agrupó en uno de los 19 diferentes haplogrupos que se han identificado hasta el presente en las poblaciones humanas. De esta manera se pudo definir genéticamente la etnia a la que pertenece cada uno. El haplogrupo L donde se incluyen los africanos, se define por tener un sitio nuevo de HpaI en la posición 3592. Los descendientes de europeos se diferencian por tener un sitio de DdeI en la posición 10394. Los descendientes de asiáticos y nativos amerindios, grupo M, se diferencian por la presencia de un sitio AluI en la posición 10397.

RESULTADOS

Determinación de la infección del HTLV-I. De las 962 muestras analizadas mediante micro ELISA, un total de 24 sueros mostraron valores de OD mayores de 15% del valor del punto de corte calculado para cada una de las pruebas efectuadas; éstas se consideraron como reactivas para HTLV-I/II.

Seroconfirmación de la infección por HTLV-I y HTLV-II. La prueba de Western blot confirmó como HTLV-I a 83.3% (20/24) de las muestras que fueron reactivas por las pruebas de micro ELISA (Gráfica 1A). Una de las muestras (código 0725) perteneciente a un hombre mestizo de 65 años proveniente de Moñitos, mostró un patrón de Western blot compatible con el de la infección por HTLV-II (Gráfica 1B); reconfirmó este resultado el análisis de PCR con cebadores específicos para el



Gráfica 1A. Patrones de Western blot para HTLV-I de sueros de individuos seropositivos de diferentes poblaciones del departamento de Córdoba. Los números en el borde superior corresponden a distintas muestras incluidas en este estudio. En el borde izquierdo se muestran las masas moleculares relativas de cada una de las bandas de proteínas virales reactivas al correspondiente suero

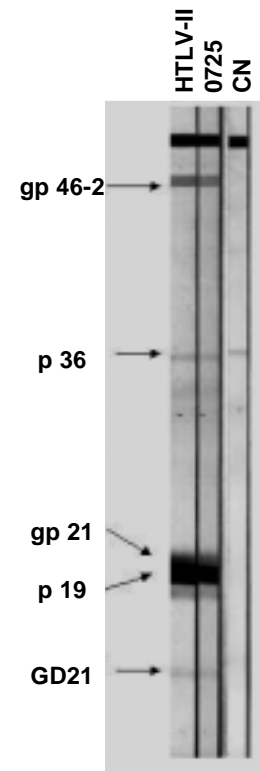
HTLV-II.

Las mayores frecuencias de infectados por el HTLV-I se determinaron en los rangos de edad entre 20 y 30 años (35%) y entre 31 y 40 años de edad (40%) (Cuadro 2). Del total de la muestra 55% (11/20) de los seropositivos eran mestizos, 30% (6/20) negros y el resto caucásicos (Cuadro 2). Tres de las muestras clasificadas como HTLV-I pertenecían a pacientes con PET/HAM. La seroprevalencia total de la infección por el HTLV-I en la muestra poblacional del departamento de Córdoba fue 2.1% (20/962), mientras que para el HTLV-II fue 0.1% (1/962). Para cada una de las localidades muestreadas, se determinaron frecuencias variables de seropositivos para el HTLV-I (Cuadro 3).

Caracterización molecular de aislados del HTLV-I. El ADN de linfocitos de cinco personas seropositivos se so-

metió a análisis molecular para determinar el subtipo. De ellos 3 se incluyeron en el subtipo africano b y dos en el cosmopolita a. El alineamiento de una región de 660 pb de las secuencias LTR obtenidas mostró un porcentaje equivalente de nucleótidos A, G, C y T (25%). En total se registraron 27 sustituciones puntuales cuyas frecuencias fueron: A→T (9/27), C→T (4/27), C→G (6/27), A→C (1/27), A→G (4/27) y T→G (3/27) (Gráfica 2).

El análisis filogenético de la región LTR usando los tres métodos diferentes, mostró agrupaciones con topologías muy similares. En la Gráfica 3 se presenta el árbol filogenético enraizado obtenido mediante el método NJ; en éste se observó que el subtipo cosmopolita o HTLV-Ia está separado de los subtipos HTLV-Ib, HTLV-Ic y HTLV-Id, presentando valores de *bootstrap* de



Gráfica 1B. Western blot para HTLV-II de la muestra del individuo 0725. Los valores indicados por las flechas corresponden a las bandas reactivas para diferentes proteínas virales. (HTLV-II) control positivo del estuche. (CN) control negativo del estuche.

74% para NJ y 86% para MP que son significativos.

Los aislados colombianos del departamento de Córdoba incluidos en este trabajo, se ubicaron dentro del subgrupo B o japonés, mostrando gran divergencia con aquellos aislados de indígenas colombianos previamente informados que se incluyeron dentro del subgrupo A o transcontinental. Este nuevo agrupamiento de aislados colombianos incluidos dentro del subgrupo japonés, presentó valores de *bootstrap* de 100% para NJ y 99% para MP que fueron significantes.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la infección por los virus linfotrópicos humanos tipos I y II en zonas costeras e

Cuadro 1
Número de acceso a la base de datos GenBank y origen geográfico para las secuencias de la región LTR que se utilizaron en el análisis filogenético del HTLV-I

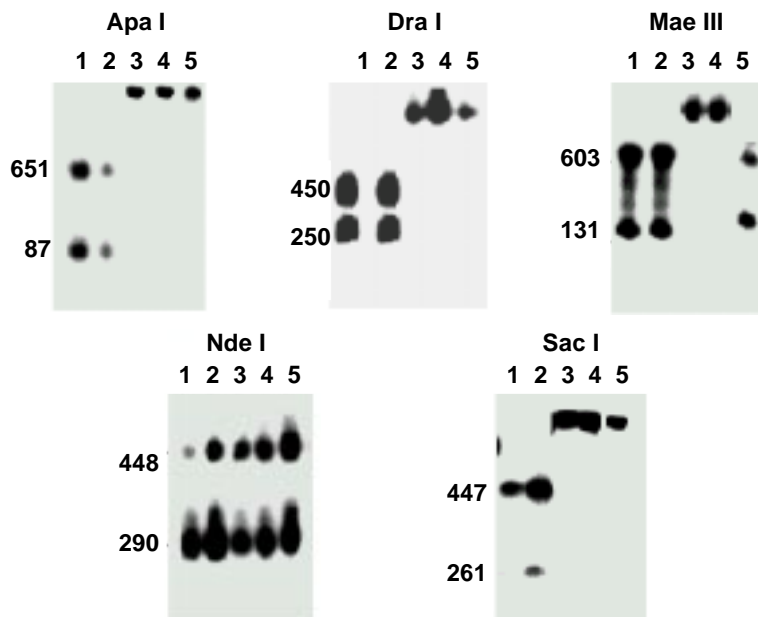
Aislado LTR	Número GenBank	Origen geográfico
BO	U12804	Argelia
ARGDOU	AF007751	Argentina
ARGFF	AF007752	Argentina
ARGGAY	AF007753	Argentina
ARGSOT	AF007754	Argentina
AMA	X88871	Brasil
BRASP08	AF014670	Brasil
BRASP21	AF014660	Brasil
BRASP22	AF014661	Brasil
BRASP23	AF014662	Brasil
BRASP31	AF014663	Brasil
BRASP51	AF014667	Brasil
FCR	X88873	Brasil
JCP	X88875	Brasil
MAQS	X88876	Brasil
MASU	X88877	Brasil
CH26	D23690	Chile
col001	D82946	Colombia
col001A	D82946	Colombia
col013	D82947	Colombia
col013B	D82947	Colombia
col084	D82948	Colombia
col084C	D82948	Colombia
col433	D82949	Colombia
col433D	D82949	Colombia
SIB170B	D23691	Colombia
SIB190E	D82950	Colombia
SIB220F	D82951	Colombia
HS35	D00294	Jamaica
AINU	D23694	Japón
ATK1	J02029	Japón
H5	X88874	Japón
HAM284A	AB036349	Japón
HC1020A	AB036348	Japón
HC33B	AB036352	Japón
HC57A	AB036350	Japón
HC5B	AB036353	Japón
HC66A	AB036351	Japón
HC7B	AB036354	Japón
MT2	Z31660	Japón
MT4	Z31661	Japón
TBH-5	L76027	Japón
PR144	U12807	Marruecos
PR52	U12806	Marruecos
MEL5	L02534	Melanesia
BI2	Y16482	Perú
BI3	Y16783	Perú
Me1	Y16478	Perú
Me2	Y16479	Perú
Me3	Y16480	Perú
Ni1	Y16484	Perú
Ni2	Y16485	Perú
Ni3	Y16486	Perú
Qu1	Y16475	Perú
Qu2	Y16476	Perú
Qu3	Y16477	Perú
TBH-1	L76026	Sur África
TBH-2	L76025	Sur África
EL	S74562	Zaire

Cuadro 2
Distribución por rango de edades, sexo y grupo étnico de los individuos seropositivos para el HTLV-I en diferentes localidades del departamento de Córdoba

Rango de edad	Sexo		Seropositivos para HTLV-I (%) IC (95%)	Grupo étnico*		
	M	F		Mestizo	Negroide	Caucasoide
0-30	4	3	7/20 (35)	4/7	3/7	0/7
31-40	6	2	8/20 (40)	4/8	2/8	2/8
41-50	1	1	2/20 (10)	1/2	0/2	1/2
51-60	0	1	1/20 (5)	1/1	0/1	0/1
> 61	1	1	2/20 (10)	1/2	1/2	0/2

Cuadro 3
Seroprevalencia de la infección por el HTLV-I en diferentes localidades en el departamento de Córdoba

Municipio	Nº total de individuos	Seropositivos para el HTLV-I	% de seropositivos confirmados IC 95%
Montería	420	4	0.95
San Antero	168	3	1.79
Cerete	127	1	0.79
San Pelayo	112	2	1.79
Moñitos	69	7	10.15
Lorica	19	3	15.80



Gráfica 2. Patrones de hibridización en *southern* de polimorfismos de tamaño en los fragmentos de restricción (RFLPs) de ADN proviral de HTLV-I obtenidos por la digestión de un fragmento de 737 bp de la región 3'LTR con las endonucleasas de restricción Apa I, Dra I, Mae III, Nde I y Sac I

1. Mont-002. 2. Mont-022. 3. Mont-047. 4. Mont-46. 5. Mont-010

MT2 LTR	CCCCTTTTCG	GAACCTGTCC	CTGACGTGTC	CCCCCGAAGA	CATTTTCATAA	GCTCAGACCT
002 LTRG.T.G.AG.
022 LTRG.T.A.
047 LTRG.T.G.AG.
010 LTRG.T.A.
046 LTRCC.T.
MT2 LTR	CCGGGAAGCC	ACCGGGAACC	ACTCATTTCC	ATCCCATGTT	TGTCAAGCCG	TCCTCAGGGC
002 LTRC.C.
022 LTRA.
047 LTRC.C.
010 LTRC.
046 LTRC.T.
MT2 LTR	TTGACGACAA	CCCCTCACCT	CAAAAAACTT	TTTCATGGCAG	G CATATGGCT	CAATAAACTA
002 LTR
022 LTR
047 LTR
010 LTR
046 LTR
MT2 LTR	A CAGGAGTCT	ATAAAAAGCGT	GGAGACAGT	CAGGAGGGGG	CTCGCATCTC	TCCTTCACGC
002 LTR
022 LTR
047 LTR
010 LTRT.
046 LTRTTC.
MT2 LTR	GCCCCCGGCC	CTACCTGAGG	CCGCCATCCA	CGCCGGTTGA	GTCGCGTTCT	GCCGCCTCCC
002 LTR
022 LTR
047 LTR
010 LTRG.C.
046 LTR
MT2 LTR	GCCTGTGGTG	CCTCCTGAAC	TGCGTCCGCC	GTCTAGGTAA	GTTTAAAGCT	CAGGTCGAGA
002 LTR
022 LTR
047 LTR
010 LTR
046 LTR
MT2 LTR	CCGGGCCTTT	GTCGGCGCT	CCCTTGGAGC	CTACCTAGAC	TCAGCCGGCT	CTCCACGCTT
002 LTRC.
022 LTR
047 LTRC.
010 LTR
046 LTR
MT2 LTR	TGCCTGACCC	TGCTTGCTCA	ACTCTACGTC	TTTGTTCGTT	TTTCTGTTCT	GCGCCGTTAC
002 LTRG.
022 LTRA.
047 LTRG.
010 LTR
046 LTR
MT2 LTR	AGATCGAAAG	TTCCACCCTT	TTCCCTTTCA	TTCACTGACTG	ACTGCCGGCT	TGGCCACGG
003 LTR
022 LTR
047 LTR
010 LTRC.
046 LTR
MT2 LTR	CCAAGTACCG	GCGACTCCGT	TGGCTCGGAG	CCAGCGACAG	CCCATCCTAT	AGCACTCTCA
002 LTRC.
022 LTR
047 LTRC.
010 LTRA.
046 LTRA.
MT2 LTR	GGAGAGAAAT	TAAAGCCGAA	TTNTGCAGAT	ATCATCAACT	GGCGGCCGGT	CGAGCATGCA
002 LTRA.
022 LTRA.
047 LTR
010 LTR
046 LTRGA.C.

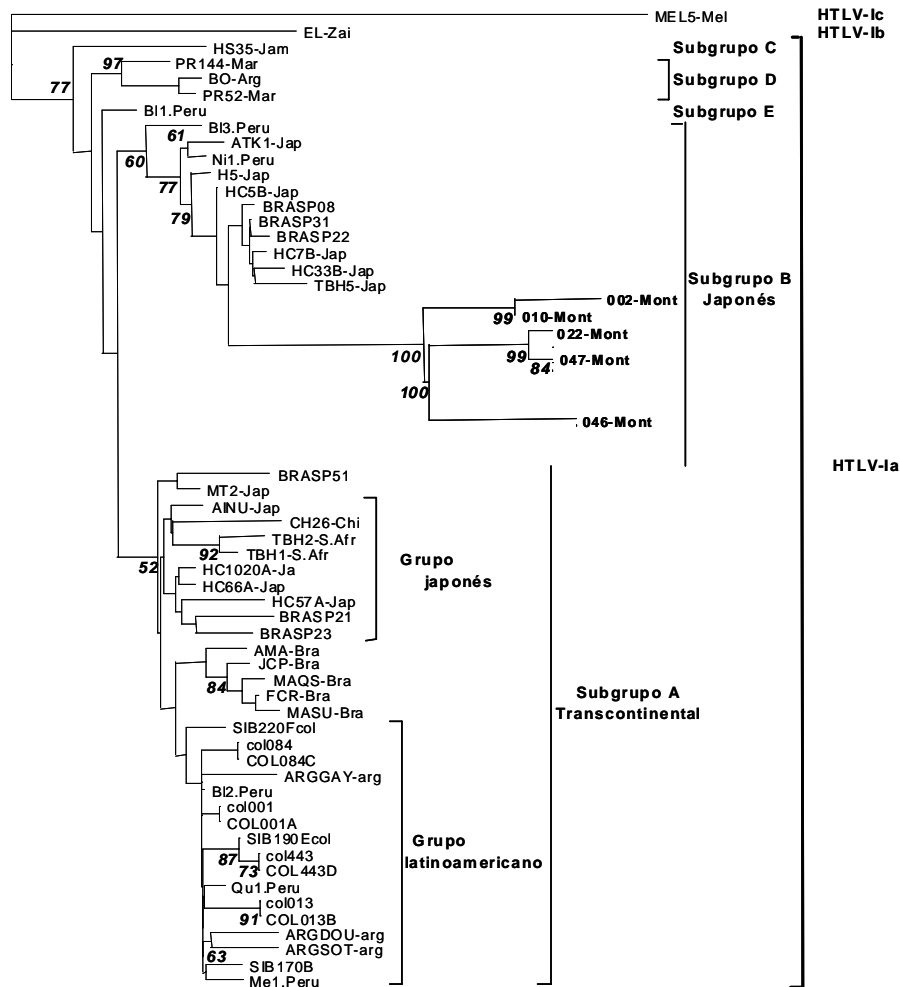
Gráfica 3. Alineamiento de una región de 660 pb de cinco secuencias LTR de provirus de individuos seropositivos para el HTLV-I provenientes de diferentes áreas del departamento de Córdoba. (MT2) cepa prototipo de HTLV-I

interiores de la región occidental de la costa Caribe colombiana. El registro de la infección tanto por HTLV-I como por HTLV-II en poblaciones del departamento de Córdoba, es un aspecto que contribuye al entendimiento de la epidemiología de la infección por estos dos retrovirus humanos.

La mayoría de los trabajos epidemiológicos sobre la infección por el HTLV-I en Colombia se ha realizado en la costa pacífica y la región central. En ellos se documenta de forma detallada la existencia de zonas endémicas en la costa pacífica (Tumaco, Guapi y Buenaventura) donde las seroprevalencias varían de 1.1% a 2.8 %^{16,17}. Sin embargo, en comparación con los estudios realizados en la costa pacífica hasta el momento de realizar este trabajo, existían muy pocos estudios epidemiológicos que documentaran la circulación de estos virus en las poblaciones caribeñas colombianas⁴⁸⁻⁵⁰.

El presente estudio mostró que 55% (11/20) de las muestras HTLV-I seropositivas correspondieron a individuos mestizos, en contraste con 30% registrado para los individuos de etnia negra (6/20) y 15% para los caucásicos (3/20). Estos resultados demuestran la elevada frecuencia de la infección por el HTLV-I en la población mestiza del departamento de Córdoba que se incluyó en el estudio.

Epidemiológicamente se ha documentado la exclusión geográfica de la infección por HTLV-I de la del HTLV-II^{17,51,52}. En este estudio se determinó y confirmó la presencia de HTLV-II en una muestra proveniente del municipio de Moñitos, donde también se registró la infección por HTLV-I. Este resultado muestra la cocirculación de los dos virus en dicha población del departamento de Córdoba. Es importante destacar que el único trabajo en que se describen infecciones traslapadas geográficamente de los dos virus en Colombia



Gráfica 4. Árbol filogenético NJ de secuencias LTR de diferentes aislados del HTLV-I de distintas áreas del mundo incluyendo los provenientes del departamento de Córdoba, Colombia. Los códigos corresponden a los números de acceso a la base de datos del GenBank descritos en el Cuadro 1. Los números al pie de cada rama son los valores de *bootstrap* calculados mediante NJ y ML respectivamente. Las letras en mayúscula en el origen de cada nodo corresponden a los grupos de aislados que se incluyeron para la evaluación del reloj molecular de la región LTR

es el de Dueñas-Barajas *et al*⁵³. Sin embargo, también es importante destacar la alta circulación del HTLV-I a lo largo de las poblaciones que se incluyeron dentro del estudio.

Con el fin de obtener los datos iniciales sobre la epidemiología molecular del virus, se analizaron mediante RFLP en un segmento de 701 pb de la región 3'LTR cinco de los aislados del HTLV-I de este estudio. Los resultados obtenidos mostraron la circulación del subtipo

cosmopolita con las variantes cosmopolita a y del africano occidental b. Los tres aislados caracterizados como africanos b correspondieron a individuos de etnia negra de la población de Moñitos. Estudios efectuados en las poblaciones del suroccidente colombiano también documentaron la existencia del subtipo cosmopolita con cuatro variantes, de las cuales las africanas se distribuyeron preferencialmente en los municipios de la costa pacífica⁵⁴⁻⁵⁶.

Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencia a la propuesta de que una de las rutas de introducción del virus al continente suramericano ocurrió probablemente durante el tráfico de esclavos provenientes del África Ecuatorial durante la colonización.

Mediante el análisis de secuencias de nucleótidos de la región LTR efectuado en el presente trabajo, los autores postulan que tanto el subgrupo transcontinental como el subgrupo japonés, no están agrupados en relación con los demás subgrupos que conforman el HTLV-Ia lo que sugiere de nuevo un posible origen africano para estos dos subgrupos. Lo anterior es importante porque el agrupamiento de los aislados del departamento de Córdoba incluidos dentro del subgrupo japonés, permite postular que provenga indirectamente de un origen africano.

Los presentes resultados ampliaron el panorama de circulación de la infección por el virus en Colombia. En futuros trabajos se deberá profundizar mucho más los estudios epidemiológicos para estudiar factores asociados con el endemismo de la infección por el virus en estas regiones.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue financiado con fondos de COLCIENCIAS en convenio con la Universidad del Valle y la Corporación Universitaria del Sinú. Los autores agradecen la asistencia técnica del señor Flavio Cerón investigador adjunto y del doctor Jesús Cabrera investigador del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis, Facultad de Salud, Universidad del Valle y profesor de la Universidad del Tolima. Además, al Hospital San Jerónimo de Montería, A los estudiantes de medicina de la Corporación Universitaria del Sinú, del grupo semilla de investigación Orlando González, Hasmet González, Judi Arias,

Alberto Caballero y Embert Amaya. Este trabajo se realizó cumpliendo con las normas vigentes para el nivel 2 de bioseguridad.

SUMMARY

Introduction. We studied the seroprevalence of human lymphotropic virus (HTLV) types I and II infection in several towns of the Department of Cordoba in the Colombian Caribbean region.

Materials and methods. By ELISA and Western blot we screened a total of 962 sera. From proviral PBMC DNA of five HTLV-I seropositive individuals RFLP and sequencing of LTR region was performed.

Results. Twenty samples were confirmed as HTLV-I and one as HTLV-II. The seroprevalence for HTLV-I in the sample of the department of Cordoba was 2.07% (20/962) and 0.104% (1/962) for the HTLV-II. The genetic analysis showed that three isolates were classified as West African b and two as Cosmopolitan a.

Conclusion. The present is the first report of HTLV-I and II infection in towns of Cordoba Department in Colombia.

Key word: HTLV-I. HTLV-II. Epidemiology. Molecular subtypes.

REFERENCIAS

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo R. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 7: 7415-7419.
- Hinuma Y, Nagata K, Hanoka M. Adult T-cell leukemia: antigens in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 78: 6476-6480.
- Gessain A, Francis H, Sonan C. HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Africa. *Lancet* 1986; ii: 698.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986; i: 1031-1032.
- Arango C, Concha M, Zaninovic' V, Borrero I. Epidemiology of tropical spastic paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Ann Neurol* 1988; 23 (suppl): 161-165.
- Trujillo CM, Concha M, Muñoz A, et al. Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1992; 8: 651-657.
- Osame M, Izumo S, Igata A. Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet* 1986; ii: 104-105.
- Itoyama Y, Minato S, Kira J. Altered subset of peripheral blood lymphocytes in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *Neurology* 1988; 38: 816-818.
- Jacobson S, Zaninovic' V, Mora C. Immunological findings in neurological diseases associated with antibodies to HTLV-I: activated lymphocytes in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol* 1988; 23 (suppl): 196-200.
- Osame M, Igata A. The history of discovery and clinic-epidemiology of HTLV-I associated myelopathy (HAM). *Jpn J Med* 1989; 28: 412-414.
- Yamaguchi K. Human T lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet* 1994; 343: 213-222.
- Blattner WA, Saxinger C, Riedel D, et al. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3: 1102-1108.
- Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, et al. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I: Demographic determinants. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 1114-1124.
- Cartier L, Araya F, Castillo JL, Ruiz F, Gormaz A, Tajima K. Progressive spastic paraparesis associated with human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Intern Med* 1992; 31: 1257-1261.
- Pombo de Oliveira MS, Tabak DG. The significance of phenotyping leukemias using monoclonal antibodies. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23: 763-772.
- Arango C, Concha M, Zaninovic' V, et al. Epidemiology of tropical spastic paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Ann Neurol* 1988; 23 (Suppl): 161-165.
- Zamora T, Zaninovic' V, Kajiwarra M, Komoda H, Hayami M, Tajima K. Antibody to HTLV-I in indigenous inhabitants of the Andes and Amazon regions in Colombia. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 715-719.
- Verdier M, Bonis J, Leonard G, Dumas M, Denis F. HTLV-I Antibody class and subclass distribution in African TSP and control populations. *J Neurol* 1993; 42: 117-120.
- Offor E, García-Vallejo F, Essex M. HTLV-I Infection in asymptomatic individuals in Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 446.
- Mahieux R, Ibrahim F, Mauclere P, et al. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) strains. Identification of a new and distinct HTLV-I molecular subtype in Central Africa in pigmies. *J Virol* 1997; 71: 1317-1333.
- Mboudjeka I, Zekeng L, Yamoshita M, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-I isolates in Cameroon, including those of the Baka pigmy. *J Cancer Res* 1997; 88: 619-624.
- Román GC, Spencer PS, Schoenberg BS, et al. Tropical spastic paraparesis in Seychelles Island: A clinical and case control neuroepidemiologic study. *Neurology* 1987; 37: 1323-1328.
- Nerurkar VR, Song KJ, Saitou N, Melland RR, Yanagihara R. Interfamilial and intrafamilial genomic diversity and molecular phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Papua Nueva Guinea and the Solomon Island. *Virology* 1993; 196: 506-513.
- Nerurkar VR, Miller MA, León-Monsón ME, et al. Failure to isolate human T-cell lymphotropic virus type I and to detect variant-specific genomic sequence by polymerase chain reaction in Melanesians with indeterminate Western immunoblot. *J Gen Virol* 1992; 73: 1805-1810.
- Hoshino H, Nakamura T, Tanaka Y, Miyoshi I, Yanagihara R. Functional conservation of the neutralizing domains on the external envelope glycoprotein of cosmopolitan and Melanesian extrains of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I. *J Infect Dis* 1993; 168: 1368-1373.
- Bastian I, Gardner J, Webb D, Gardner. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. *J Virol* 1993; 67: 843-851.
- Wang CH, Yang CS. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I infection in Taiwan. *Cancer Res* 1988; 48: 5042-5044.
- Nerurkar VR, Babu PG, Song K J, et al. Sequence analysis of human T-cell lymphotropic virus type I strains from Southern India: gene amplification and direct sequencing from whole blood blotted onto filter paper. *J Gen Virol* 1993; 74: 2799-2802.
- Seyfert S, Blum S. HTLV-I associated myelopathy in China. *J Neurol* 1994; 241: 398-400.
- Dosik H, Denic S, Patel N, Krishnamurthy M, Levine PH, Clark JW. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Brooklyn. *JAMA* 1988; 259: 2255-2257.
- Hale A, Leung T, Sivasubramaniam S, Kenny J, Sutherland S. Prevalence of antibodies to HTLV-I antenatal clinic attenders in south east London. *J Med Virol* 1997; 52: 326-329.
- Yamashita M, Picchio G, Veronesi R, Ohkura S, Bare P, Hayami M. HTLV-I in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-I in Africa. *J Med Virol* 1998; 55: 152-160.

33. Voevodin A, Gessain A. Common origin of human T-lymphotropic virus type I from Iran, Kuwait, Israel and La Reunion Island. *J Med Virol* 1997; 52: 77-82.
34. Voevodin A, Al-Mufus, Farah S, Khan R, Miura T. Molecular characterization of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) found in Kuwait: close similarity with HTLV-I isolates originating from Mashhadi, Iran. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 1255-1259.
35. Voevodin A. Substitutions T-->C 4783 and T->C 6569 in the pol and env genes of HTLV-I are characteristic for the isolates originating in the Middle East. *Leukemia* 1997; 11 (Suppl 3): 52-53.
36. Nerurkar VR, Song KJ, Melland RR, Yanagihara R. Genetic and phylogenetic analyses of human T-cell lymphotropic virus type I variants from Melanesians with and without spastic myelopathy. *Mol Neurobiol* 1994; 8: 155-173.
37. Liu H, Vandame AM, Kasad K, Carton H, Desmyter J, Goubau P. Familial transmission and minimal sequence variability of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Zaire. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1135-42.
38. Olaleye OD, Ekwezer CC, Li ZL, et al. Human T-cell lymphotropic virus types I and II infections in patients with leukemia/lymphoma and in subjects with sexually transmitted diseases in Nigeria. *Arch Virol* 1996; 141: 345-355.
39. Chen, Y-MA, Okayama A, Lee T-H, Tachibana N, Mueller N, Essex M. Sexual transmission of human T-cell leukemia virus type I associated with presence of anti-tax antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1182-1186.
40. Komurian-Pradel F, Pelloquin F, Sonoda S, Osame M, de The G. Geographic subtypes demonstrated by RFLPs following PCR in the LTR region of HTLV-I. *AIDS Res Retroviruses* 1992; 8: 429-434.
41. Komurian F, Pelloquin F, De-The G. *In vivo* genomic variability of the human T-cell virus type I depends more upon geography upon pathologies. *J Virol* 1991; 65: 3770-3778.
42. Soto L, García-Vallejo F, Renjifo B, Domínguez MC, Vergara A, Essex M. Antibodies in gingival crevicular fluid in patients with tropical spastic paraparesis-HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Viral Immunol* 1995; 8: 141-150.
43. García-Vallejo F, Bonilla R, Gallego G, Rugeles M, Borrero I. Amplificación de segmentos de ADN del virus linfotrópico humano I (HTLV-I) en pacientes con paraparesia espástica tropical y seropositivos asintomáticos. *Colombia Med* 1992; 23: 50-56.
44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York: Ed. Cold Spring Harbor Press; 1989.
45. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Rev* 1980; 39: 783-791.
46. Nei M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Genet* 1996; 30: 371-403.
47. Torroni A, Huoponen K, Francalari P, et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 1996; 144: 1835-1850.
48. Dangond F, Daza JS, Rosania A, et al. Tropical spastic paraparesis on the Caribbean coast of Colombia. *J Trop Med Hyg* 1995; 52: 155-158.
49. Egea E, Blank A, Garavito G, et al. Restricción étnica y geográfica de la infección por HTLV-II y su asociación con el polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad en tres poblaciones del Caribe colombiano. *Acta Med Colomb* 1999; 24: 137-143.
50. Navas M, Iglesias A, Martínez B, Caraballo L. Prevalencia de anticuerpos contra HTLV-I en población negra del Caribe. *Biomedica* 1995; 15: 34-36.
51. Kondo T, Kono H, Miyamoto N, et al. Age- and sex-specific cumulative rate and risk of ATLL for HTLV-I carriers. *Int J Cancer* 1989; 43: 1061-1064.
52. Zaninovic V, Sazón Y, López F, et al. Geographic independence of HTLV-I and HTLV-II foci in the Andes Highland, the Atlantic Coast and the Orinoco of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 97-101.
53. Dueñas-Barajas E, Bernal JE, Vaught DR, et al. Coexistence of human T-cell lymphotropic virus type I and II among Wayuu indians from the Guajira region of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 1851-1855.
54. García-Vallejo F, Chávez M, Domínguez MC, Blank A. Microagregación genética y geográfica de aislados del virus linfotrópico humano Tipo I (HTLV-I) en zonas endémicas del suroccidente de Colombia. *Colomb Med* 2000; 31: 110-117.
55. Domínguez MC, Castillo A, Cabrera J, Eizuru Y, Akiba S, García-Vallejo F. Envelope sequence variation and phylogenetic relations of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type I from endemic areas of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 887-890.
56. Balcázar N, Sánchez G, García-Vallejo F. Sequence and phylogenetic analysis of Human T-lymphotropic virus type I from Tumaco, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 641-648.