

Evaluación seroepidemiológica y molecular del virus linfotrópico de las células T del humano (HTLV) en Cuba durante el periodo 2009 a 2017

Martín Alfonso Dayamí^(1*);
Liuber Yans Machado^(2*);
Otto Cruz Sui^(1*);
Dr Héctor Manuel Díaz^(3*);

- (1) Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Laboratorio de InmunoEnsayos. Subdirección Científico-Productiva. Mayabeque, Cuba, cicdc@infomed.sld.cu
(2) Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil. Laboratorio de Biología Molecular. Subdirección Científico-Productiva. Mayabeque, Cuba, cicdc@infomed.sld.cu
(3) Hospital Clínico-Quirúrgico "Hermanos" Ameijeiras. Consulta de Infectología. hectorm@infomed.sld.cu.

Introducción: El virus linfotrópico de las células T humanas (HTLV) es el primer retrovirus que se identifica en el humano, en 1980. En la actualidad se han estimado 1,5 billones de individuos infectados y es endémico de la cuenca del Caribe. La infección requiere del contacto célula-célula por lo que su diagnóstico es vital en programas como la certificación de la sangre, sus productos derivados y la medicina transfusional. Nuestro país cuenta con las condiciones objetivas para el desarrollo de la pesquisa activa del virus. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue mostrar los resultados de la pesquisa serológica del virus HTLV en el periodo 2009 a 2017, en muestras provenientes de sitios centinelas cubanos. **Materiales y métodos:** Las muestras se evaluaron en el ELISA DAVIH HTLV y en las que las reactivas por segunda vez, se les realizó su confirmación en el DAVIH BLOT HTLV. Los confirmados se incluyeron en un estudio de genotipificación molecular, con uso de cebadores para HTLV-1 y II. **Resultados:** Se confirmaron un donante, un individuo con paraparesia (con alineación genotípica al grupo Cosmopolita, subgrupo A Transcontinental HTLV-I), un contacto sexual, un familiar y uno con linfoma cutáneo. La seroprevalencia general fue 0,097% y en donantes de 0,025%, lo que demuestra la circulación en los asintomáticos y que la sangre donada es una vía efectiva de propagación en Cuba. La cifra de nuevos casos se incrementó a 40. **Conclusiones:** Los resultados reafirman la importancia de la pesquisa activa de HTLV en Cuba, con especial interés donantes.

Palabras clave: Diagnóstico serológico, virus linfotrópico de las células T, ELISA, pesquisa activa .

I. INTRODUCCIÓN

humano como son, la leucemia/ El virus linfotrópico de las células T humanas (HTLV) es el primer retrovirus que se identifica en el humano y se aísla por primera vez en 1980. Este virus causa diversas afectaciones asociadas a los sistemas inmunológico y nervioso del cuerpo linfoma de las células T (ATL) y la paraparesia espástica tropical (PET) (1), también se asocia con la uveítis, la bronconeumonitis, la artritis y la polimiositis (1, 2).

Este virus es endémico de zonas como África subsahariana, Japón, América del Sur y la cuenca del Caribe y en la actualidad se ha estimado 1,5 billones de individuos infectados en el Mundo (2). El 95 % de los individuos infectados con el virus permanecen asintomáticos y solo el 5% desarrollan alguna de estas afecciones. En las regiones endémicas, el desarrollo de ATL y HAM/TSP constituye el principal indicativo de la circulación de HTLV en la población (3).

La infección por HTLV requiere del contacto célula-célula y la transmisión puede ocurrir por contacto sexual, por la transmisión vertical y es muy eficiente por la exposición a productos celulares y la transfusión de sangre infectada con el virus y por esta razón se han desarrollado diversos métodos de pesquaje y confirmación serológica para detectar HTLV en los individuos donantes (4). El diagnóstico de este virus es vital en programas como la certificación de la sangre y sus productos derivados y la medicina transfusional (3).

En el Caribe se han realizado diversos estudios poblacionales, con un índice de prevalencia que oscila entre 3% and 6%. En Cuba se realizó un estudio seroepidemiológico entre 1989 y 1990, en el cual no se reportaron casos de infección por HTLV en nuestra población (5,6) y este hecho hizo suponer que la circulación del virus en Cuba era limitada; sin embargo, como parte de las acciones para establecer un sistema de vigilancia de este virus en el país en 1990 se diagnostica el primer caso de seropositivo en la provincia de Matanzas con una forma aguda de leucemia/linfoma de células T del adulto (7) y entre 1991 y 1996 en un estudio de más de 26 000 personas con diferente comportamiento de riesgo, se estimó una seroprevalencia cercana a 0,05% que aunque inferior a la reportada para el área caribeña demostraba la circulación de HTLV en nuestra población y también confirmaba la necesidad de establecer la alerta ante su diseminación (8).

En 1996 se estableció una vigilancia centinela del virus en los servicios hematológicos de los Hospitales "Hermanos Ameijeiras" (Habana, Cuba) y "Faustino Pérez" (Matanzas, Cuba). Posteriormente otros sitios centinelas se activaron en siete provincias donde se insertaron servicios hematológicos, neurológicos, bancos de sangre provinciales, centros de hemodiálisis y en los que fueron identificados más de cuarenta nuevos casos de individuos seropositivos a este virus (9, 10).

En estudios recientes también se mostró la circulación del virus en la provincia Santiago de Cuba en la cual no se había realizado ningún reporte de circulación del HTLV hasta este estudio (11, 12)). Con el estudio en esta provincia, se realiza un completamiento de reportes realizado en la zona oriental de nuestro país donde el intercambio con las islas caribeñas ha sido mayor que para la parte occidental. El desarrollo de estos estudios evidencia cada vez más que existe un sub-registro de la seroprevalencia cubana actual, lo cual refuerza la idea de la necesidad de la toma de acciones para el establecimiento de un pesquaje nacional.

Nuestro país cuenta con las condiciones objetivas para el desarrollo de la pesquisa activa del virus. Por una parte, la disponibilidad de diagnosticadores de producción nacional para el diagnóstico de HTLV que complementa la sostenibilidad de un algoritmo de diagnóstico de esta entidad viral en Cuba y la presencia del Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC), que ha sido de-

signado por nuestro Ministerio de salud Pública como Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de Retrovirus humanos y donde se acomete la producción de los sistemas comerciales cubanos DAVIH HTLV y el DAVIH BLOT HTLV para el pesquiasaje y confirmación serológica de la infección por HTLV. El principal propósito de este trabajo fue mostrar los resultados de la pesquisa serológica del virus HTLV, utilizando el algoritmo de diagnóstico establecido en el CICDC.

II. MÉTODO

Se estudiaron 1592 muestras, de las cuales 1500 muestras fueron de donantes (población más cercana a la normal), 35 politransfundidos y 77 con condiciones de riesgo (condiciones neurológicas, hematológicas) distribuidos de la siguiente forma: cuatro contactos sexuales de seropositivos, 24 individuos con síntomas neurológicos, nueve familiares, 40 individuos con linfoma cutáneo; que fueron seleccionados en sitios centinelas establecidos para la pesquisa serológica del virus HTLV en las provincias La Habana y Santiago de Cuba, durante el periodo de 2009 a 2017.

En la generalidad de los individuos que participaron en el estudio, como parte de los aspectos éticos a tener en cuenta, se realizó un procedimiento de consentimiento informado.

En donantes se realizó el muestreo sistemático partiendo de una primera muestra tomada al azar. En individuos transfundidos se realizó un muestreo aleatorio simple tomando como referencia, el control sistemático llevado a cabo en los servicios hematológicos, de acuerdo al Programa de Medicina Transfusional de Cuba.

Las muestras se evaluaron en el sistema ELISA DAVIH HTLV (CICDC, Cuba). A las muestras que resultaron reactivas por segunda vez se les realizó su confirmación en el sistema DAVIH BLOT HTLV (CICDC, Cuba) utilizando los criterios recomendados por la OMS para el diagnóstico confirmatorio.

Los resultados de laboratorio fueron utilizados en el manejo clínico de los individuos en estudio. En los individuos clasificados como seropositivos a HTLV se les aplicó la encuesta epidemiológica referida en el Plan Estratégico Nacional ITS/VIH/sida. Además de los datos generales, se colectó información acerca de la vía potencial de contagio así como sus contactos sexuales. En los individuos seropositivos con síntomas clínicos se aplicó la encuesta epidemiológica referida en el Protocolo de enfermedades e infecciones causadas por retrovirus humanos aprobado por la Comisión de Aplicación de las Prácticas Médicas del Hospital "Hermanos Ameijeiras". En los donantes seropositivos se tomó la metodología de manejo clínico establecida en el Programa cubano de Medicina Transfusional cubano.

Se calculó la seropositividad al virus HTLV en cada grupo de estudio y se realizó una comparación bioestadística de los resultados con estudios similares al que se presenta.

En individuos clasificados como seropositivos se realizó un análisis molecular para lo cual se extrajo una muestra de 10 mL de sangre total con EDTA para detectar el ADN viral por una reacción en cadena de la polimerasa (ADN) con cebadores específicos para HTLV y amplificándose genes *tax* y *pol*. La extracción se realizó con columnas midi spin High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostic, IN, USA) según instrucciones del fabricante. La amplificación de *pol* se realizó con cebadores para HTLV I y II, cuyas secuencias se listan en la Tabla 1.

Tabla 1:

SK-110-I	5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3'
SK-111-I	5'- GTGGTGAAGATGCCATCGGGTTTT-3'
SK-110-II	5'-CCATACAACCCCACCAGTAG -3'
SK-111-II	5'-GTGGTGGATTGCCATCGGGTTTT- 3'
pol 1.1	5'-TTGTAGAACGCTCTAATGGCATT- 3'
pol 3.1	5'- TGGCAGTTGGTTAACACATTTCAGG-3'
pol 1.2	5'-CCTGGTCGAGAGAACCAATGGTG- 3'
pol 3.2	5'-CCACTGGGGTTCATGACATTTACG- 3'

En la amplificación de la región *tax* se utilizaron los cebadores SK-43-I (CGGATACCCAGTCTACGTGT-3')/SK-44-I (5'-GAGCCGATAACGCGTCCATCG-3') and inner primers sense SK-43/SK-44 (5'-GTGTTTGGCGATTGTGTGTACA-3') y SK-43/SK-44 (5'-CCATCGATGGGGTCCCA-3').

Los productos de la PCR fueron 135 bp para *pol* de HTLV-I, 137 pb para *pol* of HTLV-II y 128 bp para *tax*. Para el análisis filogenético la región 3'LTR se amplificó con PCR anidada utilizando 8200LA (5'-CTCACACGGCCTCATACAGTACTC-3') /3Vext (5'-CGCAGTTCAGGAGGCACC-3') como cebadores y 8200LA/3Vint (5'-GAACGCRACCTCAACCGGCRYGGATGG-3') (528 pb, ATK-1 posición genómica 96-8699). La secuenciación en ambas direcciones se realizó con el Genome Lab TM Dye Terminator Cycle Sequence y el estuche Quick Start según las instrucciones del fabricante (Beckman Coulter, Inc, CA) con los cebadores de la PCR anidada. Los productos de la secuenciación se leyeron en un analizador genético CEQ TM 8800 (Beckman Coulter, Inc, CA). Los árboles Neighbor-joining (NJ) and de Máxima Verosimilitud (MV) se construyeron con el programa PAUP 4.0 []. El modelo K2+G se seleccionó para el análisis filogenético (parámetro alpha=0.64). The modelo de nucleótidos se estimó utilizando el Modeltest.

El acceso al reporte de la secuencia en GenBank es JX871882. En el análisis filogenético se utilizaron secuencias de referencia de diversas regiones geográficas.

La evaluación clínica en los casos de seropositivos clasificados para diagnóstico positivo de paraparesia espástica y de linfoma/ se realizó de acuerdo al Manual de Prácticas Médicas del Hospital "Hermanos Ameijeiras.

III. RESULTADOS

Resultaron seropositivos con patrones serológicos completos en un individuo donante, un individuo con paraparesia, un contacto sexual de seropositivo ya confirmado, un familiar y un individuo con linfoma cutáneo.

La seroprevalencia general en el estudio fue 0,097%.

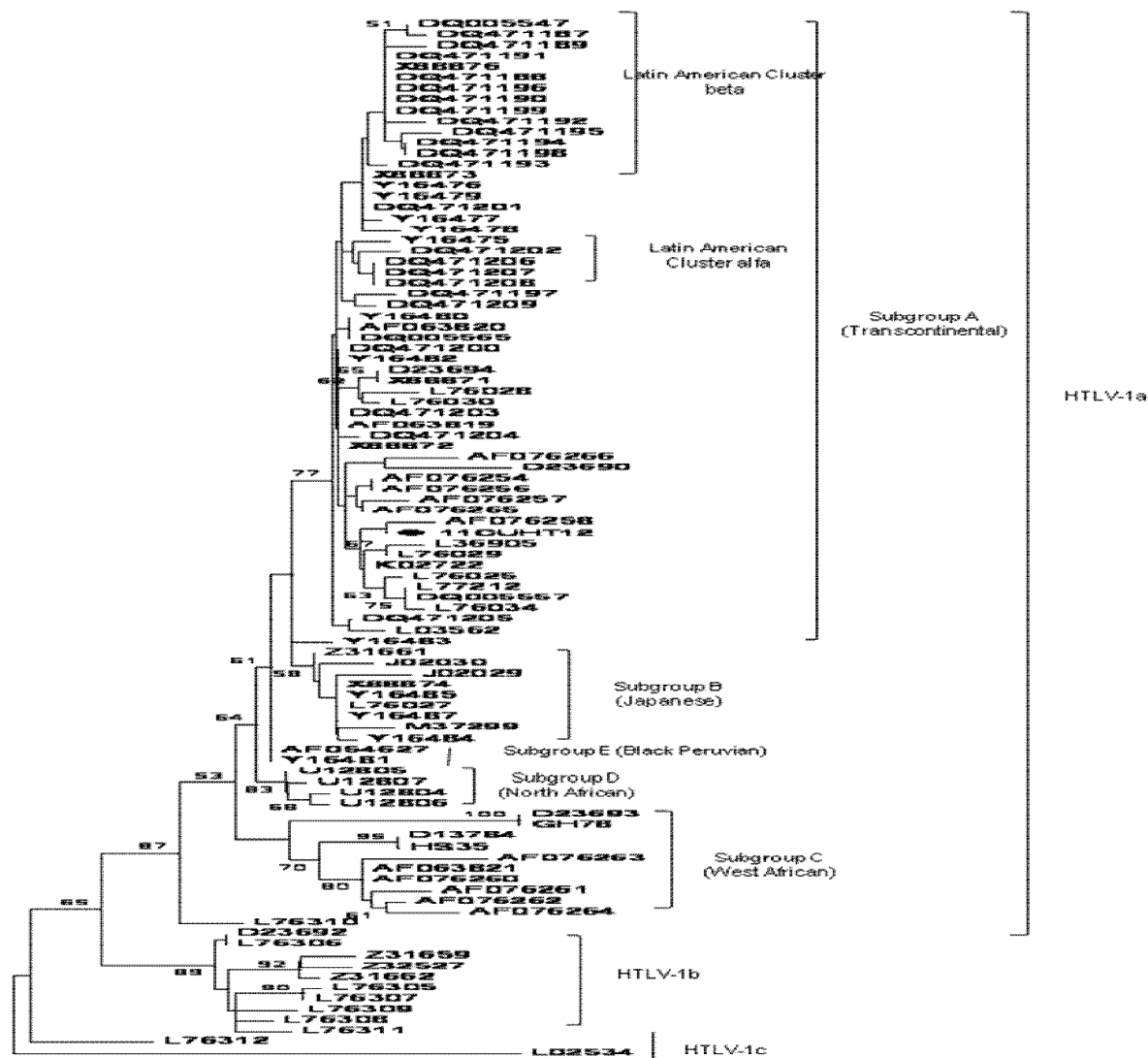


Figura 1. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de la muestra del individuo donante de Santiago de Cuba.

En donantes, la seropositividad aumentó a 0,025% (un seropositivo cada 4000 muestras estudiadas) lo que demuestra la circulación en los asintomáticos y que la sangre donada constituye una vía efectiva de propagación de la infección por HTLV en Cuba.

En la Figura 1 se muestra el árbol filogenético obtenido para la muestra del individuo con paraparesia, nuevo caso de la provincia Santiago de Cuba, cuya secuencia se encuentra reportada en Genbank

con el número de referencia JX871882.

El análisis molecular mostró que la muestra del individuo con paraparesia fue positiva por PCR para los genes *tax*, *pol* y región 3'LTR) y negativo para HTLV-II. El resto no amplificaron para HTLV I y II. Esta muestra alineó con las cepas latinoamericanas y caribeñas del grupo Cosmopolita subgrupo A Transcontinental de HTLV-I, lo que refuerza como posible fuente de contagio, la relación geográfica de Santiago de Cuba con islas del Caribe cercanas.

Con estos resultados, la cifra de nuevos casos de seropositivos a HTLV en Cuba se incrementó a 40 casos.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados reafirman la importancia de la pesquisa activa para la búsqueda de nuevos individuos infectados con HTLV con especial interés en el grupo de donantes

REFERENCIAS

1. Gallo, R.C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrov* 2005, 2, 17.
2. Takatsuki, K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrov* 2005, 2, 16.
3. Rooster, R.C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-I and HTLV-II. *Oncogene* 2005; 24(39):5926-30.
4. Osame, M., Janssen, R., Kubota, H., Nishitani, H., Igata, A., Nagataki, S. et al. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol* 1990, 28, 50-56.
5. Navea L, Silva E, Rivero R, Hernández P. anti HTLV-1 antibodies screening in wicked hemopathies. *Rev Cub Hematol Inmunol Hemoter* 1990; 6 (1): 101-6.
6. Hernández P, Rivero R, Ballester M, Navea L, Matutes Y, Catovsky D y colaboradores. Very low seroprevalence of HTLV-I / II in Cuba: antibodies in blood donors and in hematological and non-hematological patients. *Vox Sang* 1991; 61:277-78.
7. Muñio JE, Díaz HM, Carnot J, of Castro R, Navea L, Rodríguez I. HTLV Leukemia /lymphoma. First case in Cuba. *Rev Cub Med* 2003 42(3).
8. Lubián A.L, Díaz HM, Silva E, Pérez MT, Cruz O.R., Arzola, J.L. et al. Seroprevalence tasa of the HTLV-I infection in different risky groups studied in Cuba. *Rev Cub Med* 1998; 37 (4): 199.204.
9. Díaz HM, Álvarez N, Muñio J, Lubián A. L, Martin D, Díaz D.F., et al. Infection for HTLV-I in patients with linfoproliferative syndromes in two Cuban sentinel places. *Rev Panam Salud Pub* 2010; 27 (1): 17-22.
10. Díaz HM. Situación clinico-epidemiológica de la infección por el virus HTLV en diferentes grupos poblacionales en Cuba. Tesis doctoral. Instituto Superior de Ciencias Militares "Dr. Luis Díaz Soto", 2010.
11. Martin, D; Díaz DF; Issac O, Machado LY, Romay D; Díaz H. Evidence of the Human T cell lymphotropic virus (HTLV-I) circulation in Santiago de Cuba province (Cuba). *Primary & Acquired Immunodeficiency Res* 2013; 3:1, doi: 10.4172/2324-853X.1000106.

12. Martín D. Evidence of human T cell lymphotropic virus (HTLV) circulation in the cuban southeast area. Journal Frontiers in Immunonology. doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00173. ISSN 1664-322-1.