ACIN
ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE INFECTOLOGÍA

infectio

ARTÍCULO ORIGINAL

Infección por virus HTLV-1/2 confirmada por serología y detección de provirus en pacientes ecuatorianos de paraparesis espástica tropical

Carmen Mosquera[1,2], Elvia Aspiazu[1,2], Jacobus H. de Waard[3], Miguel Angel Garcia-Bereguiain[3,*]

Resumen

Introduccion: La infección con el virus linfotrópico de células T humano (HTLV) de tipo 1 y 2 es endémica en América del Sur. Existen muy pocos reportes clínicos de este retrovirus en pacientes de Ecuador y nunca confirmaron la presencia del virus con el aislamiento o la detección de su ADN. Esta infección se encuentra desatendida por las autoridades de salud pública, sin que existan estudios epidemiológicos de prevalencia a nivel del país.

Objetivos: Este estudio tiene como objetivo la detección de infección por HTLV -1/2 en individuos sintomáticos de paraparesis espástica tropical (TSP) utilizando por primera vez en Ecuador diagnóstico serológico y la detección del provirus por biología molecular.

Diseño del estudio. Se tomaron muestras de nueve pacientes con un diagnóstico de mielopatía y sospechoso de TSP, que fueron analizadas para la detección del virus HTLV-1/2 usando tres metodologías: ELISA comercial, ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IF) y PCR anidada.

Resultados: Cinco de los 9 (55.5%) pacientes fueron positivos tanto para la prueba de ELISA como para IF y PCR anidada.

Conclusión: La alta prevalencia de infección por HTLV-1/2 entre individuos sintomáticos de mielopatía muestra la endemicidad de este retrovirus en Ecuador, la asociación de HTLV-1/2 con TSP y la necesidad de implementar estrategias de control y prevención para evitar la diseminación de esta enfermedad infecciosa desatendida.

Palabras clave: HTLV-1, HTLV-2, paraparesis espástica tropical, Ecuador, ELISA, PCR.

HTLV-1/2 virus infection confirmed by serology and provirus DNA detection in tropical spastic paraparesis Ecuadorian patients

Abstract

Background: Infection with the Human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type 1 and 2 is endemic in South America. There are only a few clinical reports of this retrovirus in patients in Ecuador, without employing virus-isolation methods or viral DNA detection. The infection is usually neglected in health care settings and by public health authorities and no country wide prevalence data are available.

Objectives: This study aims to detect the HTLV-1/2 infection in symptomatic individuals for tropical spastic paraparesis (TSP) using for the first time in Ecuador both immunological and molecular biology methodologies.

Study Design: Blood samples of 9 symptomatic individuals with myelopathy were analyzed for the detection of the HTLV-1/2 virus with three methods: ELISA, an indirect immunofluorescence (IF) assay and a nested-PCR.

Results: Five out of 9 (55.5%) myelopathy patients were positive for ELISA, IF and nested- HTLV-1/2 PCR.

Conclusion. The high prevalence of HTLV-1/2 infection among myelopathy patients shows the endemicity of this retrovirus in Ecuador, the association of HTLV-1/2 infection with TSP and the need of the implementation of control and prevention interventions to overcome the further dissemination of this neglected infectious disease.

Keywords: HTLV-1, HTLV-2, tropical spastic paraparesis, Ecuador, ELISA, PCR.

1. Laboratorio de Virología. Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación "Leopoldo Izquieta Pérez". Guayaquil (Ecuador).
2. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Guayaquil. Guayaquil (Ecuador).
3. One Health Research Group. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Américas. Quito (Ecuador).

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: magbereguiain@gmail.com
One Health Research Group. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Américas, Sede Queri, Quito. Ecuador. Telephone: + 593-0996484127.

Recibido: 23/09/2019; Actualizado: 14/10/2019; Aceptado: 20/10/2019

Cómo citar este artículo: C. Mosquera, *et al*. Infección por virus HTLV-1/2 confirmada por serología y detección de provirus en pacientes ecuatorianos de paraparesis espástica tropical. Infectio 2020; 24(2):57-60

Introducción

El virus linfotrópico humano de células T de tipo 1 (HTLV 1/2) tiene una distribución a nivel mundial y se estima que hay entre 20 y 30 millones de personas infectadas en el mundo[1-4]. La variabilidad en la prevalencia depende de la localización geográfica existiendo regiones que son consideradas endémicas para HTLV 1/2 en zonas de Asia, Africa, el América Central, el Caribe y América del Sur[2,3,5-7]. En regiones no endémicas como Europa y América del Norte, la infección por el HTLV se asocia mayoritariamente a los migrantes procedentes de zonas endémicas[2,3,8].

Los virus HTLV 1 y HTLV2 presentan diferentes patogénesis y manifestaciones clínicas asociadas. En ambos casos, aunque la infección persiste durante toda la vida y la mayoría de individuos infectados son asintomáticos. La transmision de HTLV es similar a la de otros retrovirus como el HIV o los virus de hepatitis B y C. Las vías de transmisión más importante son la tranmisión vertical, lactancia, transmisión sexual y transfusiones de sangre u órganos[2,7-10]. La infección por HTLV 2 no ha sido asociada claramente con ninguna patología, aunque hay reportes que indican que sería factor de riesgo para algunos tipos de leucemia, eritrodermatitis y desórdenes neurológicos periféricos[2,4,11]. Por el contrario, para la infección con HTLV 1 se estima que alrededor de un 4-5% desarrolla leucemia adulta de células T (una proliferación maligna de céluas CD4+) y un 2-3% desarrolla una miolepatía discapacitante conocida como paraparesia espástica tropical (TSP) o mielopatía asociada al HTLV 1[2,12]. TSP es una enfermedad progresiva crónica desmielinizante que afecta la medula espinal y la sustancia blanca del SNC que afecta principalmente a adultos. La sintomatología inicial incluye debilidad de los miembros inferiores (más raramente de los superiores), dolor lumbar, incontinencia urinaria e impotencia, así como progresiva rigidez en la marcha y espasticidad, incluso ataxia en estadíos avanzados de la enfermedad; ademas síntomas sensoriales (quemazón) e hiperreflexia de las extremidades inferiores[7,12].

La infección por HTLV y las patologías asociadas como la TSP son muy poco atendidas en diversos países de América del Sur, siendo particularmente grave la situación de Ecuador. De acuerdo a un reciente reporte técnico sobre la distribución mundial de HTLV del Centro Europeo para Control y Prevención de Enfermedades, Ecuador es considerado país con ausencia de información fiable sobre la epidemiología de HTLV[2] a diferencia de los países vecinos Perú y Colombia donde exiten varias publicaciones al respecto en las que se han reportado altas prevalencias de HTLV 1 de hasta 13.9%[7,13-16]. Además, tanto en Perú como en Colombia se lleva a cabo tamizaje de bancos de sangre para descartar donantes infectados con HTLV y evitar la diseminación del virus[7,8,15]. Sin embargo, sólo existen dos reportes sobre prevalencia de HTLV en individuos asintomáticos en Ecuador, uno de ellos para un población pequeña (142 individuos) que data de 1994 donde se reporta una prevalencia de 2.8%, y una reciente publicación de nuestro grupo donde reportamos una prevalencia del 3.5% en población afrodescendiente en la provincia de Esmeraldas también en un muestreo relativamente pequeño de 237 individuos[17,18]. Además, de acuerdo a las búsquedas bibliográficas realizadas en bases de datos de publicaciones internacionales (Pub Med y Scopus) tan sólo existen 3 publicaciones de casos clínicos de patologías asociadas a la infección por HTLV1 en Ecuador, en concreto dos reportes de casos de TSP con infección por HTLV sólo confirmada por pruebas inmunológicas de hace más de una década y un reporte de caso clínico de TSP, también solamente confirmado por pruebas inmunológicas, en un paciente de trasplante de riñón de donante portador de HTLV 1[10,19,20].

Por tanto, existe una importante carencia de publicaciones sobre prevalencia de infección por HTLV 1 en Ecuador y casos clínicos de patologías asociadas como TSP que contribuye al desconocimiento y desatención de esta enfermedad por las autoridades sanitarias del país. Junto a nuestra reciente publicación sobre prevalencia de infección por HTLV 1/2 en población afrodescendiente asintomática en Ecuador, el objetivo de este trabajo es reportar la alta prevalencia (55,5%) de infección por HTLV confirmada por primera vez en el país por prueba específica de PCR anidada en pacientes con mielopatía con sintomatología compatible con TSP. Estos resultados confirman la endemicidad de esta infección en el país y esperamos que sirvan de alerta a las autoridades sanitarias ecuatorianas sobre la necesidad de implementar políticas de salud pública para esta enfermedad tropical desatendida.

Materiales y métodos

Población de estudio y toma de muestras. Un total de 9 pacientes con sintomatología sospechosa de TSP fueron incluidos en el estudio: 2 pacientes del Hospital Luis Vernaza de Guayaquil, 2 pacientes del Hospital de la Armada de Guayaquil, 1 paciente del Hospital del Seguro (IESS) de Guayaquil, 4 pacientes de laboratorios del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación Leopoldo Izquieta Pérez en Esmeraldas (2 pacientes) y Santo Domingo de los Tsáchilas (2 pacientes). Estos casos corresponden a todos los pacientes sospechosos de TSP en hospitales públicos de Ecuador, según criterio de los médicos que atendieron a los mismos, cuyas muestras fueron derivadas al Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación para confirmación por pruebas moleculares de infección por HTLV 1/2 (desde el año 2008 en que fueron implementadas hasta la actualidad). De cada paciente se tomó una muestra de sangre periférica en tubo de 5mL con EDTA siguiendo protocolos estándar.

Procesamiento de las muestras de sangre. Cada muestra de 5mL fue dividida en dos partes: 2 mL fueron centrifugados a 12000 rpm para aislamiento de plasma y los restantes 3 mL fueron utilizados para aislamiento de linfocitos empleando "Lymphocyte Separation Medium" (Lonza Walkersville Inc., U.S.A) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Detección de HTLV 1/2 por ELISA. Las muestras de plasma se utilizaron para la prueba de ELISA para HTLV 1/2 con un kit comercial (DIALAB, Austria) siguiendo las recomendaciones del fabricante. De acuerdo al manual del kit, la sensibilidad y especificidad del mismo son 100% y 99,99%, respectivamente.

Detección de HTLV 1/2 por Inmunofluorescencia Inderecta y PCR anidada. A partir de los aislamientos de linfocitos para la muestra de sangre de cada paciente, se realizaron pruebas de IF y PCR anidada. Para el ensayo de IF se siguió el protocolo facilitado por el Instituto Nacional de la Salud de Chile (21). Para la PCR anidada, se realizó aislamiento de ADN a partir de los aislamientos de linfocitos empleando el kit "QIAamp DNA Blood Mini Kit" (QIAGEN, Netherlands), y la detección del DNA de HTLV 1/2 se realizó utilizando el protocolo de PCR anidada descrito en las referencias 22 y 23. Brevemente, se utilizaron dos sets de primers para el gen *tax/rex;* para la primera reacción de PCR los primers emplaeados fueron fw 5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3' y rv 5'-GAGCCGATAACGCGTCCATC-3'; para la reacción de PCR anidada los primers empleados fueron fw 5'-GTGTTTGGCGATTGTGTACA-3' y rv 5'-CCATCGATGGGGTCCCA-3'. Los amplicones de 185 bp (primera PCR) y 128 bp (PCR anidada) se separaron en geles de agaron al 2% teñidos con bromuro de etidio, y analizados con un equipo imager Gel DoC XR system (BioRad). Las pruebas de IF y PCR anidada utilizadas en este estudio no permiten diferenciar entre los virus HTLV de tipo 1 y 2.

Aprobación del estudio por Comité de Bioética. El Comité Científico del Instituto de Salud Pública e Investigación Leopoldo Izquieta Perez (Guayaquil, Ecuador) aprobó este estudio. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado y recibieron los resultados de las pruebas.

Conflicto de intereses. Los autores de este estudio certifican que no existe ningún conflicto de intereses en relación al trabajo realizado.

Resultados

Los resultados de las pruebas de ELISA, IF y PCR anidada se resumen en la Tabla 1. 5 de los 9 pacientes con mielopatía, 5 (55,5%) resultaron positivos para las 3 pruebas. Los otros 4 pacientes (44.5%) fueron negativos para todas las prubeas. De acuerdo al fabricante, la especificidad y sensibilidad del kit de ELISA es de 99.9% y 100%, respectivamente, lo cual queda verificado en este caso por las pruebas altamente específicas de IF y PCR anidada.

Table 1. Resultados de prueba de HTLV-1/2 con ELISA, IF y PCR anidada en 9 pacientes con sintomatología de TSP (los pacientes positivos fueron los mismos para todas las pruebas).

Resultado	ELISA	IF	PCR anidada
Positivo	5 (55.5%)	5 (55.5%)	5 (55.5%)
Negativo	4	4	4

Discusión

En este estudió donde se involucró a 9 pacientes con síntomas neurológicos compatibles con TSP, las pruebas de ELISA, IF y PCR anidada confirmaron la infección por HTLV 1/2 en 5 de los 9 casos (55.5%) con mielopatía . Es importante notar como la especificidad y sensibilidad del la prueba de ELISA coincidió con lo reportado por el fabricante cuando se compara con las otros dos pruebas, IF y PCR anidada, para las que se asume que esos parámetros son del 100%. Estos resultados apoyan la utilización de diagnóstico clínico combinado con prueba de ELISA para un diagnóstico eficiente de TSP. No obstante, dado que las pruebas empleadas no permiten diferenciar entre virus HTLV de tipo 1 y 2, aunque la TSP ha sido asociada fundamentalmente a HTLV 1, sería recomendable implementar adicionalmente técnicas de PCR anidada específicas para HTLV 1.

Existen solamente dos estudios relativos a la prevalencia de HTLV 1/2 en Ecuador. Uno de ellos, data de 1994 y reporta una prevalencia de 2.8% para HTLV 1/2[17]. El otro estudio fue recientemente publicado por nuestro grupo de investigación, donde se reporta una prevalencia de HTLV 1/2 para población afrodescendiente de Esmeraldas del 3.5%[18]. Sin embargo, la limitación de ambos estudios radica en el relativo pequeño tamaño de las muestras, de 142 y 237 individuos, respectivamente[17,18]. Adicionalmente, tan sólo existen 3 artículos científicos sobre patologías asociadas a infección por HTLV 1/2 en Ecuador, todos ellos relativos a TSP. Uno de ellos describe un reporte de caso clínico en 2016[10], mientras que los otros dos estudios son de hace más de una década[19,20]. Por tanto, la alta prevalencia de infección por HTLV 1/2 en pacientes sintomáticos de TSP en Ecuador reportada en este estudio, unido al estudio de prevalencia recientemente publicado por nuestro grupo, confirma la endemicidad de HTLV 1/2 en ecuador y la necesidad de divulgar estudios como el presente para que sean tenidos en cuenta por el personal médico ecuatoriano para un apropiado diagnóstico. Además, las poblaciones indígenas y afrodescendientes de las Américas son consideradas poblaciones de riesgo para la infección por HTLV 1/2, y en el caso de Ecuador, de acuerdo al al último censo de 2010, dichas poblaciones constituyen 4% y 3% del total de la población, respectivamente.

Concerniente los 4 pacientes con mielopatía, pero negativo por las pruebas de diagnóstico de la infección por HTLV-1/2 y considerados por el examen médico como potenciales paciente con TSP, sería recomendable buscar otra causa transmisible o no transmisible de la mielopatía. Aunque hay reportes de casos de TSP documentado como HTLV-1 seronegativo[24], el consenso más aceptado es que la detección de anticuerpos contra HTLV-1/2 es necesaria para el diagnóstico de TSP; de forma que un resultado positivo por ELISA o IF deben ser confirmado ya sea por análisis de Western Blot o por detección de ADN del virus[25], tal como se realizó en el presente estudio.

Conclusión

Por todo lo expuesto anteriormente, unido a la gravedad de las patologías asociadas a la infección de HTLV 1/2, esperamos que este trabajo ayuda a visualizar la necesidad que de manera urgente las autoridades sanitarias ecuatorianas, de forma similar a lo que realizan países vecinos como Perú o Colombia[7,13-15], implementen estrategias para el control y prevención de esta infección, en particular el tamizaje de bancos de sangre y órganos para evitar la propagación del virus HTLV 1/2.

Contribución de los autores

Todos los autores participaron en la concepción del estudio. Carmen Mosquera y Elvia Aspiazu recolectaron las muestras y realizaron las pruebas diagnóstico.

Todos los autores participaron en el análisis de los datos obtenidos.

Jacobus de Waard y Miguel Angel García Bereguiain escribieron el artículo, y todos los autores revisaron la versión final del artículo.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este artículo no se hicieron experimentos con personas ni animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran los datos tuvieron un manejo ético y confidencial de la información según las normas constitucionales y legales sobre protección de datos personales (Ley habeas data).

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflictos de interés

Financiación. Ninguna

References

1. de The ´ G and Bomford R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993. 9(5):381–6.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection. Stockholm: ECDC. 2015.
3. Gessain A and Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 2012. 3:388.
4. Murphy EL, Cassar O and Gessain A. Estimating the number of HTLV-2 infected persons in the world. *Retrovirology*. 2015. 12(Suppl 1):O5.
5. Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Hisada M, et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica*. 2006; 19(1):44–53.
6. Murphy EL, Wilks R, Hanchard B, Cranston B, Figueroa JP, Gibbs WN, et al. A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. *Int J Epidemiol*. 1996; 25(5):1083–9.
7. Gotuzzo E, Verdonck K, González E and Cabada M. Virus Linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1): una infección endémica en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2004. 21(4): 253-260.
8. Alessio L, Minichini C, Starace M, Occhiello L, Caroprese M, Di Caprio G, et al. Low prevalence of HTLV1/2 infection in a population of immigrants living in southern Italy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018. 12(6): e0006601.
9. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005; 24(39):6058–68.
10. Montesdeoca-Andrade MJ, Correa-Diaz EP, Buestán M E. HTLV-1-associated myelopathy in a solid organ transplant recipient. *BMJ Case Rep*. 2016. doi:10.1136/bcr-2016-215243.
11. Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. AIDS Reviews. 2004. 6; p. 144–54.
12. Goncalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araujo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010. 23, p. 577–89.
13. Trujillo JM, Concha M. Muñoz A, Bergonzoli G, Mora C, Borrero I, Gibbs CJ and Arango C. Seroprevalence and Cofactors of HTLV-I Infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1992. 8 (5): 651-657.
14. Domínguez MC, Salcedo M and García-Vallejo F. Serological and virological evaluation of human T-lymphotropic virus type 1 infection in family groups from Tumaco, Colombia. *Biomédica*. 2015. 35: p 337-346.
15. Bermúdez-Forero MI, Berrío-Pérez M, Herrera-Hernández AM, Rodríguez-Rodríguez MJ, García-Blanco S, Orjuela-Falla G, Beltrán M. Prevalencia de la infección con el virus linfotrópico de células T humanas de tipo 1 y 2 en donantes de sangre en Colombia, 2001-2014: implicaciones sobre la seguridad de la transfusión. *Biomédica*. 2016. 36(Supl.2):194-200.
16. Alvarez C, Verdonck K, Tipismana M, et al. A Peruvian family with a high burden of HTLV-1- associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMJ Case Rep*. 2015. doi:10.1136/bcr-2015-209619.
17. Guderian R, Guevara A, Cooper P, Rugeles MT and Arango C. HTLV-1 infection and tropical spastic paraparesis in Esmeraldas Province of Ecuador. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994. 88; 399-400.
18. Mosquera C, Aspiazu E, De Waard JH and Garcia-Bereguiain MA. A high prevalence of Human T-lymphotropic virus (HTLV 1/2) infection among Afro-descendants in Ecuador shows the need for the implementation of surveys and control programs. *Infection and Drug Resistance*. 2019. Jul 8; 12:1969-1974. doi: 10.2147/IDR.S204334.
19. Alarcón-Guzmán T and Alarcón-Avilés T. Tratamiento de la Paraparesia Espástica Tropical con Pentoxifilina: Estudio Piloto. Revista Ecuatoriana de Neurología. 2002. 11 (1): 1-3.
20. Alarcón T, Hidalgo C, Aguirre R, Díaz E, Santibáñez R and Navas C. Mielitis Crónica por HTLV1: Resultados en 45 Casos Estudiados. Revista Ecuatoriana de Neurología. 2007. 16 (3): 1-11.
21. San Martín H, Balanda M, Vergara N, Valenzuela MA, Cartier L, Ayala S and Ramírez E. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and 2 Seroprevalence among first-time blood donors in Chile, 2011-2013. *J Med Virol*. 2016;88(6):1067-75.
22. Gallegos S, Mangano A, Gastaldello R, Sen L and Medeot S. Usefulness of a Nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004. 99(4), 377–380.
23. Ramirez E, Cartier L, Villota C and Fernandez J. Genetic characterization and phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Chile. *Virus Research*. 2002. 84(1-2), 135–14.
24. Leon-Sarmiento FE, Calderon A, Hernandez HG. Two Babinski signs in seropositive (HAM) and seronegative tropical spastic paraparesis. Arq. Neuropsiquiatr. 2008. 66, 695–697.
25. Bangham CRM, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Nature Reviews Disease Primers. 2015. 2015/06/18/online. https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.12