

INTRODUCCION

Todos los organismos vivos: los humanos, las bacterias, los animales, las plantas y los insectos tienen sus propios virus, los mismos que generalmente afectan a una especie y tienden a respetar a los demás.

Existe un número considerable de familias de virus que atacan al hombre provocando múltiples enfermedades. Las principales familias de virus son el ADN virus, ARN virus y retrovirus. El presente estudio se basa en la familia de Retrovirus-oncovirus con sus dos variedades capaces de producir leucemia/linfoma de células T en el humano (HTLV1-2), en esta familia de virus también encontramos los FEVL, productores de leucemia en el gato, el BOLV, en el ganado bovino, siendo estos especie- específicos y célula-específicos. Los retrovirus en la actualidad están ocasionando un desequilibrio en la vida humana, a pesar, de que el sistema inmunológico cuenta con una gran variedad de células con funciones altamente especializadas, capaces de identificar dichos antígenos extraños y desencadenar una cascada de reacciones de defensa contra ellos (respuesta inmune).

Las células inmunológicas responsables del rechazo de los antígenos extraños son los linfocitos B, los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales (NK), para quienes abriremos un espacio en nuestro trabajo a fin de referirnos a ellas y obtener una mejor comprensión de este complejo inmunológico.

El primer Retrovirus encontrado en pacientes humanos asociado a una neoplasia leucemia/linfoma de células T en adultos (ATL) fue el virus linfotrópico tipo 1 y 2 de las células T en los años de 1980 en el Sudoeste del Archipiélago de Japón, en diversas islas del Caribe, parte del continente Africano y América del Sur, especialmente en los países de las costas del Pacífico ocasionando una enfermedad neurológica denominada paraparesia tropical espástica mieloma asociada a HTLV.

Se realizó el estudio en un sector del Norte de Esmeraldas especialmente en los pueblos de San Lorenzo, Borbón, a lo largo del río Santiago y Onzole, en una reserva de aborígenes de la región (Cayapas) donde se encontró los primeros casos de pacientes portadores de este virus, confirmándose la presencia de ATL en seis pacientes, que fueron atendidos en el Hospital del Seguro Social en Guayaquil, otros casos están siendo estudiados por médicos militares hasta confirmar la enfermedad causada, por lo que es necesario el seguimiento de la casuística en este sector; tomando en cuenta que este virus puede permanecer en forma latente por muchos años sin producir enfermedades.

Sería importante que en nuestro país se realice obligatoriamente pruebas de HTLV a los donadores de sangre para evitar los riesgos de contagio y aplicar las recomendaciones generales para enfermedades de transmisión sexual, ya que el virus se transmite por contacto sexual, transfusiones sanguíneas y uso de agujas contaminadas, etc.

Anteriores investigaciones en la Provincia de Esmeraldas indican que el problema estaría en sectores como la población de San Lorenzo, y es aquí donde se ha llevado a cabo el presente estudio, para de esta manera contribuir a demostrar la posible área endémica de la infección por HTLV.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

VIRUS LINFOTROPICO HUMANO I-II

1.1 LOS RETROVIRUS. ESTRUCTURA Y PATOGENESIS

Los virus poseen una gran diversidad de dimensiones, formas y estructuras, miden entre 20 y 300 nm. de diámetro y su material hereditario consta de tres a varios cientos de genes constituidos por ácido desoxirribonucleico (ADN), similares a los existentes en las células de los organismos superiores, ya que el código genético es universal para todos los organismos vivos. (7)

La información genética almacenada en el ADN virus y en los ARN virus puede ser fácilmente leída por las células parasitadas y convertida a productos con los cuales se sintetizan nuevos virus; Sin embargo, la familia de retrovirus almacena su información genética en una forma especial de ARN no compatible con la estructura genética de las células, por ello, debe transcribir dicha información a otra molécula capaz de ser leída por la célula parasitada y convertida a productos virales, esto se logra gracias a una enzima viral que tiene por función transcribir la información viral de formato ARN a formato ADN, debido a que la enzima se conoce como TRANSCRIPTASA REVERSA (por convertir el ARN en ADN), esta familia de virus recibe el nombre de RETROVIRUS.

Los retrovirus se clasifican en tres subfamilias:

ONCOVIRUS

LENTIVIRUS

ESPUMAVIRUS

Sin embargo, es posible que en un futuro sean reclasificadas en razón de los nuevos conocimientos acumulados.

Los lentivirus se caracterizan por inducir con largos períodos de latencia sin dañar a las células y sin provocar enfermedad, de ahí su nombre (lenti=lento), después de un tiempo por la acción de algún factor capaz de provocar su estimulación (cofactor) se activan y proliferan induciendo con ello destrucción celular, lo que conduce al desarrollo tardío de la enfermedad, a esta subfamilia de retrovirus pertenecen las dos variedades que se conocen de VIH capaces de provocar SIDA en el humano, así como a un grupo de virus productores de enfermedad en la ovejas (VISNA) cabras (CAEV) caballos (EIAV) simios (SIV), al igual que los otros virus, los lentivirus son especie-específicos y células-específicos.(7)

Los spumavirus inducen degeneración espumosa en el citoplasma de las células parasitadas y de ahí su nombre (spuma=espuma), no se ha descrito enfermedad alguna en animales o humanos atribuibles a esta subfamilia de retrovirus

Los oncovirus son capaces de inducir cáncer en las células que parasitan y de ahí su nombre (onco= tumor), a esta subfamilia de retrovirus pertenecen dos variedades capaces de producir leucemia y linfoma de células T en el humano: el HTLV-1 y HTLV-2; además de un grupo de virus productores de leucemia en el gato (FEVL), en el ganado bovino (BOLV), al igual, que otros virus el HTLV-1, el HTLV-2, el FELV y el BOLV son específicos para una especie determinada (especie-específicos) y para cierta célula (célula-específicos) (7).

Dentro de la familia Retroviridae con su género Oncovirus están las especies HTLV1 y HTLV2, estos producen en el hombre una malignidad hematológica denominada leucemia de células T del adulto (LAT) y de una enfermedad neurológica crónica llamada Paraparesia Espástica Tropical, que son desde el

punto de vista epidemiológico de gran importancia (2)

1.2 EPIDEMIOLOGIA

El HTLV está presente en grupos poblacionales a través del mundo. En el Sudoeste del Japón el 20% de los adultos son seropositivos y en el Caribe del 2.5 % de los adultos negros son seropositivos. Otras áreas epidemiológicamente activas tenemos el Oeste de la Indias, el Noroeste de Sudamérica y el Sudeste de los Estados Unidos. La misma endemia se encuentra en poblaciones nativas del mundo (3)

El HTLV fue el primer retrovirus encontrado en pacientes humanos en el año de 1980 en el Sudoste del Archipiélago de Japón, en diversas islas del Caribe (Jamaica, Martinica, Haití, entre otras) partes del continente Africano y América del Sur, especialmente en las costas del Pacífico.

En Japón la presencia de anticuerpos contra el HTLV1 fue asociada con un cuadro clínico de uveitis idiopática. El HTLV2 fue aislado por primera vez en un paciente con leucemia de células pilosas. Debido al alto grado de semejanza en la secuencia del RNA del genoma viral y las reacciones cruzadas en el test serológico entre HTLV1 y HTLV2 estos virus se estudian en conjunto. Para su diferenciación se necesitan metodologías más complejas que utilizan péptidos sintéticos, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o cultivos de virus. (1).

El virus de la leucemia de las células T humanas era considerado hasta ahora como raro o directamente inexistente entre la población norteamericana. Pero recientemente, los análisis de la sangre donada a revelado que entre las aproximadamente 800.000 donaciones mensuales de sangre que se producen en EE.UU., hay que contar con cerca de 200 HTLV-1 positivas. El HTLV-1 está emparentado con el HIV. Se sospecha que es transmitido por vías similares, es

decir a través de las transfusiones de sangre, el contacto sexual y las agujas contaminadas de los drogadictos. (14).

Estudios realizados en Uruguay siempre han sido relacionados a paraparesias asociadas al retrovirus HTLV1-2, encontrando dos casos, siendo el primero un cuadro clásico de una paraparesia progresiva y el segundo una polirradiculoneuropatía de evolución crónica.

Entre 1991 hasta 1996 Cuba ha estudiado 26.352 muestras de sueros procedentes de diferentes grupos de riesgo y donantes de sangre con un porcentaje del 0.037 % (10 casos), confirmando la presencia de personas infectadas y en la mayoría de ellas el estudio epidemiológico logró esclarecer la vía probable de contagio. (9).

A diferencia de lo que ocurre con el virus del SIDA, los infectados llegan a enfermarse rara vez. Por investigaciones realizadas en el Japón y en el Caribe, donde el virus tiene mayor difusión, se sabe que cerca del 1% de los infectados contrae una leucemia o un linfoma, y que un porcentaje algo mayor desarrolla una sintomatología que se asemeja a la esclerosis múltiple. Hasta la manifestación de las dos patologías pueden transcurrir decenios.

Siendo relativamente pocos los que llegan a enfermarse, algunos expertos sostienen que es demasiado pronto para la generalización de un procedimiento de detección en la sangre donada. Otros consideran que ha llegado el momento de adoptar esta medida. Si dentro de diez o veinte años se produjera una epidemia, sería demasiado tarde para actuar.

Los Center for Disease Control de Atlanta (Georgia) próximamente darán a conocer pautas sobre la manera de informar a los infectados. (14)

Los primeros estudios en El Ecuador se realizaron con 280 casos en la

población urbana de Esmeraldas y se encontraron 2 casos seropositivos, recomendando los investigadores continuar los estudios en otros sectores como San Lorenzo, Borbón, etc. e indios nativos Cayapas (4).

1.3 FUNCIONES DEL SISTEMA INMUNOLOGICO

Para un mejor entendimiento de este gran complejo de los virus veremos las funciones del sistema inmunológico.

El sistema inmunológico tiene varios objetivos.

1. - Objetivo inmediato: que es el de producir una respuesta protectora contra los diversos agentes agresores (antígenos) procedentes del medio externo (microorganismos y sus toxinas) como del medio interno (mutaciones celulares) el sistema inmunológico es capaz de identificar dichos antígenos extraños y desencadenar una cascada de reacciones de defensa contra ellos (respuesta-inmune). (7).
2. - Objetivo mediato: que es el de mantener la integridad del organismo para preservar la salud.

1.3.1 Componentes celulares del sistema inmunológico:

Para alcanzar sus objetivos el sistema inmunológico cuenta con una gran variedad de células con funciones altamente especializadas, lo que garantiza su precisión, destreza y perfección de funcionamiento.

1.3.2 Sistema fagocitario mononuclear

Las células del sistema fagocitario mononuclear (SFM) se encuentran en los epitelios (células de Langerhans) en los ganglios y bazo (células dendríticas) en la sangre (monocitos) en los tejidos (macrófagos, histiocitos, etc.) y en el sistema nervioso (células de la Glia).

Su función consiste en captar a los antígenos extraños y procesarlos en forma adecuada a las células inmunológicas responsables de su rechazo

1.3.3 Células inmunológicas

Las células inmunológicas responsables del rechazo de los antígenos extraños son los linfocitos B, los linfocitos T citotóxicos y las células asesinas naturales (NK)

1.3.4 Linfocitos B

Ante la presentación de la muestra del antígeno procesado por las células del SMF (sistema fagocitario mononuclear), el linfocito B produce anticuerpos, los cuales viajan por la circulación de su sitio de producción (ganglios o bazo) al sitio donde se localiza el antígeno extraño con el objeto de eliminarlo, siempre y cuando este se localice fuera de las células tisulares como son los gérmenes piógenos y sus toxinas. Los anticuerpos no pueden atravesar las membranas celulares y por ello no son capaces de atacar a los microorganismos que se encuentran establecidos en el interior de las células, como son los virus.

1.3.5 Linfocito T citotóxico

El linfocito T citotóxico, también conocido como CD8 por su marcador de membrana, responde ante el estímulo antigénico que le es presentado por las células del SMF, activándose y dirigiéndose por la circulación al sitio donde se encuentra el antígeno extraño. Los antígenos atacados por los linfocitos CD8 son células infectadas por microorganismos intracelulares (virus, mycobacterias salmonellas, hongos, protozoarios, etc.) y células que han sufrido mutación (como las células neoplásicas malignas)

1.3.6 Linfocito granular o célula NK

Una tercera variedad de células inmunológicas, conocida como linfocito granular o célula asesina o NK, tiene por función destruir células tumorales del tejido hematopoyético (linfomas y leucemias) y células infectadas por virus.

1.3.7 Inmunoregulación

La coordinación de este complejo sistema celular recae en una población de linfocitos T conocida como T colaboradores o CD4. Cuando el linfocito CD4 es estimulado por la célula del SMF portadora de la muestra del antígeno extraño que capturó, se activa y secreta diversos productos, como la INTERLEUCINA 2 (IL-2) con los cuales induce la maduración de los linfocitos B y de los linfocitos CD8, previamente estimulados por el antígeno y la célula del SMF, con el objeto de que reaccionen rechazando el antígeno: Los linfocitos B actúan contra los microorganismos piógenos y sus toxinas y los linfocitos T citotóxicos contra las células mutadas y las células infectadas.

Los linfocitos CD, por medio del interferón estimulan a las células NK a llevar a cabo su acción viricida y por medio de otros medidores como el MIF y el MAF, activan a los macrófagos a formar granulomas y así destruir los tejidos infectados por gérmenes intracelulares.

El concepto de previsión implica la idea de cierta anticipación a futuros acontecimientos o situaciones previsibles y sin lo cual sería imposible hacer planes, con el caso del sistema inmunológico se ha anticipado a acontecimientos y situaciones futuras, fabricando linfocitos B, linfocitos CD8 y linfocitos CD4 par más de un millón de posibles antígenos diferentes, esto se logra gracias a una organización genética diseñada de tal forma que con un puñado de genes puede lograr tal diversidad de células.

Se calcula que el individuo se expone durante su vida a cerca de 100.000 antígenos; sin embargo, como su sistema inmunológico ignora cuáles serían estos, se encuentra preparado de antemano para reconocer y atacar a todos los posibles antígenos gracias a la fabricación previa de un enorme repertorio, diez veces mayor de las que necesitará de anticuerpos, linfocitos CD8 y linfocitos CD4 (3).

1.4 ESTRUCTURA DEL VIRUS

El virus linfotrópico de las células T humanas es un retrovirus de la subfamilia oncoviridae con genoma de ácido nucleico (RNA) que infectan células T maduras, generalmente CD3+ y CD4+. Los retrovirus comprenden una gran familia de virus de vertebrados asociados a un amplio espectro de enfermedades, que incluyen infecciones malignas, inmunodeficiencias, enfermedades neurológicas y otras, también se presenta como una viremia asintomática. (10)

EI HTLV-1 fue el primer retrovirus aislado en pacientes humanos (Poiesz BJ.) 1980), siendo semejante a los virus que producen leucemia de bovinos (BLV) y al virus de la leucemia de células T de los simios.

La estructura de la partícula viral es semejante a los demás retrovirus. Después de entrar el virus a la célula T, su genoma es copiado por el DNA de la enzima transcriptasa reversa y luego incorporado al genoma celular, formando un provirus. La síntesis del RNA viral es afectada por enzimas celulares, usando un provirus integrado como modelo, entonces el RNA es procesado para formar las proteínas virales o también un RNA que será incorporado a las nuevas partículas virales en formación. Una porción de las partículas emerge de la superficie celular siendo este un mecanismo poco conocido.

Los virus linfotrópicos de células T humanas son virus ARN de cadena única, retrovirus de tipo C, pudiendo infectar a una gran variedad de células hematopoyéticas, pero son más tróficos y tienen su efecto más importante sobre linfocitos T del subgrupo ayudante/inductor o CD4.

EI HTLV-1 inmortaliza células T ayudantes CD4 infectadas en una forma similar a como lo hace el virus de Epstein Barr en células B infectadas.

Las células T infectadas por HTLV-1 también son activadas y así de rutina

presentan el receptor tac para interleukina 2 (IL-2) pero cuando crecen en cultivos de células presentan un bajo rendimiento de IL-2

La organización general del genoma del HTLV1/2 (aproximadamente 9.000 pares de bases) obedece a 2 retrovirus en general (gag, pol, e inv) a la vez presenta 2 proteínas adicionales (tax y rex) importantes en la expresión genética. Una réplica de HTLV es estimulada por la proteína tax que activa a los genes celulares, además se han descubierto recientemente los genes tof y rof, que codifican proteínas de funciones desconocidas. (10)

EI HTLV1 ha sido asociado a una neoplasia, leucemia/linfoma de células T de adultos (ATL) y una enfermedad neurológica, denominada Paraparesia Tropical Espástica/Mielopatía asociada a HTLV-1 (TSP/HAM). En Japón la presencia de anticuerpos contra HTLV-1 fue asociada con un cuadro clínico de uveitis idiopática.

EI HTLV-2 fue aislado por primera vez de un paciente con leucemia de células pilosas (hairy cell leukemia), pero no esta asociada con ninguna condición patológica conocida. Debido al alto grado de homología en la secuencia del RNA del genoma viral y reacciones cruzadas en pruebas serológicas entre HTLV-1 y HTLV2, estos virus se los estudia en conjunto (HTLV1-2). Para diferenciarlos es necesario usar métodos más complejos, como los que utilizan péptidos sintéticos, reacciones en cadena de polimerasa (PCR) o cultivos de virus.

1.5 DIAGNOSTICO

Varias pruebas se han hecho necesarias para establecer un diagnóstico de ATL y poder distinguir esta enfermedad de otras neoplasias de células T maduras. Entre estas tenemos:

- Estudio de sangre periférica.
- Aspiración y biopsia de médula ósea para estudios de morfología de

leucocitos.

- Perfil bioquímico de niveles séricos de calcio y deshidrogenasa láctica (DHL).
- Inmunofenotipificación de linfocitos de sangre y/o de otros tejidos comprometidos.
- Biopsias de tejidos para clasificación histológica.
- Estudio para detección de anticuerpos para HTLV por serología y/o análisis el DNA por Southern Blot con bandas específicas.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DEL HTLV

2.1 Diagnósticos serológicos

El HTLV o el genoma de HTLV tiene una estructura similar a los de HIV, esto es genes de gag, pol, env y los elementos que regulan la expresión viral. Estos productos de pol son poco descritos antigénicamente, pero el gen tax da origen a elementos que son tan importantes como antígenos.

Estos productos genéticos antigénicamente importantes (proteínas y glucoproteínas) son:

gag: p53 (precursor)

p24/26 (core o cápsula)

p19 (matriz)

p15

p26, p28, p32 (intermediarios de gag)

env: gp61/68 (precursor)

gp 46 (externa)

gp21 (transmembrana)

tax: p40 (o p38) (proteína transactivadora)

Anticuerpos contra antígenos de HTLV generalmente no presentan reacción cruzada con antígenos de HIV, con excepción de un core (especialmente p24).

La secuencia de genomas entre HTLV-I y HTLV-II son similares en un 60 %, resultado de esto son los productos proteicos relacionados y análogos. No obstante contienen algunos antígenos diferentes que permiten distinguirlos.

El diagnóstico serológico de la infección por HTLV-I/II está basado en la demostración de la presencia de anticuerpos contra antígenos del suero de los individuos. Las proteínas utilizadas como antígenos son la p19, p24 y p15.

Las pruebas serológicas usadas son las de última generación que emplean antígenos totales (virus completo) y péptidos producidos por precombinación genética con una buena sensibilidad y especificidad. (16)

Las pruebas de diagnóstico en el laboratorio se han dividido en dos grandes grupos: las pruebas de screening y las pruebas confirmatorias. Entre las pruebas más usadas tenemos:

1. Aglutinación de partículas de latex o de gelatina.
2. ELISA o EIA (enzyme linked immunosorbent assay).
3. IFA (inmunofluorescencia indirecta).
4. RIPA (radioinmunoprecipitación en gel de poliacrilamida).
5. WB (Western blot o inmunoblot).
6. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Las dos primeras pruebas son de screening, las demás son consideradas confirmatorias y la PCR es la única que diferencia HTLV-I del HTLV-II.

Se recomienda la prueba de Elisa y confirmación con Western-Blot siendo esta última positiva cuando exista reactividad tanto a proteínas de gag como de env.

Los resultados falsos positivos o difíciles de aclarar pueden diferenciarse por medio de la PCR.

En las técnicas de ELISA se detecta anticuerpos anti-HTLV-1 considerándose reactiva aquella muestra cuya densidad óptica sea igual o mayor que el valor de corte calculado para cada corrida (cutt-off)

El Western Blot es la fase final de la inmunoelectrotransferencia y se basa en los principios de ELISA indirecta sobre una membrana de nitrocelulosa donde han sido fijadas las proteínas virales.

Para interpretar los resultados seguimos los criterios recomendados por la OMS que considera la muestra negativa cuando no se observa reactividad específica contra ninguna de las proteínas codificadas por el gen de envoltura (env) ni contra las que codifica el gen de antígeno de grupo (gag) y positiva cuando aparece reactividad contra al menos una de las proteínas codificadas por el gen Env y al menos una de las que codifica el gen Gag. Otros perfiles no considerados positivos o negativos se informan como indeterminados. Las proteínas (p) codificadas por el gen Gag, según los pesos moleculares en kilodaltons (kD) son p53, p26,p24 y p19 y la del gen Env es una glucoproteína (gp) de 46 kD, gp 46.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

Tubos al vacío siliconizados de 10 ml (tapa roja)

Agujas múltiples 21 x 1 ½

Alcohol

Algodón

Torniquetes

Guantes

3.2 Equipos

Pipetas automáticas de 10, 200, 1000 ul

Dispensador automático de perlas activadas con virus

Incubadora dinámica COMMANDER

Lavador automático ABBOTT

Lector ELISA Quantum II ABBOTT

3.3 Reactivos

Reactivo de detección cualitativa de anticuerpos de HTLV-I-II ELISA ABBOTT

Acido Sulfúrico 1N

Formaldehído al 5 %

3.4 METODOS

PRINCIPIO BIOLÓGICO DEL PROCEDIMIENTO

En el método ABBOTT HTLV-I/HTLV-II EIA, se usa suero o plasma el cual se diluye con un diluyente de muestra e incubado con perlas de poliestireno impregnadas con proteínas inactivadas de HTLV-I y HTLV-II. Para el HTLV-I se usa células de linfocitos T humanas infectadas con HUT 102.B2 y para HTLV-II se usa células de linfocitos B infectadas con WIL-NRA. Los anticuerpos específicos presentes en la muestra reaccionan con los antígenos presentes en las perlas. Todos los materiales y proteínas no deseables en el ensayo son descartados mediante un lavado.

Se incuban luego las perlas con un conjugado de inmunoglobulina humana con peroxidasa (anti-Hu IgG: HRPO), si los anticuerpos específicos están presentes en la muestra se impregna con el conjugado. El exceso de conjugado es removido mediante un lavado de las perlas.

Las perlas luego se incuban con una solución de sustrato de o-Phenilendiamina (OPD) en peróxido de hidrógeno. La reacción del sustrato OPD con HRPO dan un color amarillo anaranjado. La intensidad del color formado es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. La reacción enzimática es detenida mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N y leída la intensidad de color en un espectrofotómetro a 492 nm

3.5 TÉCNICA

Reactivos del kit de ABBOTT HTLV-I/HTLV-II EIA 100 test

- 1 vial con 100 perlas de HTLV-I/HTLV-II inactivadas
- 3 viales de 1 ml cada uno de conjugado concentrado
- 3 viales de 19 ml cada uno de diluyente de conjugado
- 1 vial de 2 ml de control positivo de HTLV

- 1 vial de 2 ml de control negativo de HTLV
- 1 vial de 100 ml de diluyente de muestra
- 1 botella de 10 tabletas de OPD (o-fenilendiamina .2 CIH)
- 1 botella de 55 ml de diluyente de OPD

Preparación del conjugado

Disolver 1 vial de conjugado concentrado en un vial de diluyente de conjugado. Esta preparación es estable por 14 días a 2-8°C

Preparación de la solución de sustrato OPD

Se debe preparar cinco minutos antes de su uso. Se coloca una tableta de OPD por cada 5 ml de diluyente de OPD, esta solución preparada es estable solo por 60 minutos.

Preparación de la muestra

Se puede usar sangre sin anticoagulante o con Citrato de Sodio, EDTA sodio, EDTA potasio, heparina de sodio u Oxalato de Sodio como anticoagulante. Separar el suero o plasma en una centrífuga a 5.000 r.p.m.

Dilución de controles y muestras

En tubos de ensayo pipetear:

- 10 ul de Control Negativo + 400 ul de diluyente de muestra
- 10 ul de Control Positivo HTLV-1 + 400 ul de diluyente de muestra
- 10 ul de Control Positivo HTLV-2 + 400 ul de diluyente de muestra
- 10 ul de muestra + 400 ul de diluyente de muestra

Agitar

Colocar en una cubeta de reacción

- 200 ul de Control Negativo diluido (2 veces)
- 200 ul de Control Positivo diluido HTLV-1 (2 veces)
- 200 ul de Control Positivo diluido HTLV-2 (2 veces)
- 200 ul de muestra diluida

Colocar una perla con virus inactivado en cada pozo de la cubeta de reacción tanto en los controles como en la muestra.

Tapar la cubeta con papel adhesivo

Primera incubación

Usando una incubadora dinámica a 40°C dejar por 60 minutos en rotación.

Destapar luego del tiempo el papel adhesivo y lavar en lavador automático por una vez.

Segunda Incubación

Colocar 200 ul de Conjugado en cada pozo de reacción. Tapar con el adhesivo.

Incubar a 40°C por 30 minutos en incubadora dinámica en rotación

Luego del tiempo destapar el adhesivo y volver a lavar en el lavador automático por una vez

Desarrollo de color

Transferir las perlas a tubos de ensayo descartables y colocar 300 ul de solución de sustrato OPD usando dos blancos de muestra.

Incubar a temperatura ambiente y libre de luz por 30 minutos

Añadir luego 1 ml de ácido sulfúrico 1N en cada tubo y agitar

Usando un espectrofotómetro ELISA QUANTUM II de ABBOTT, leer frente al blanco de sustrato siguiendo las instrucciones del equipo, en un tiempo no más de 2 horas.

Lectura en el QUANTUM II

- 1 Remover las burbujas de aire antes de leer las absorbancias
- 2 Revisar si el tubo de blanco no contiene color, si es así se debe descartar

- el mismo y preparar nuevo blanco.
- 3 Determinar la absorbancia del blanco de sustrato. En Modo 0 blanquear el instrumento con un tubo con agua y leer el blanco de sustrato como una muestra. Parar el ensayo de Modo O. El valor de la absorbancia del blanco de sustrato tiene que estar en relación con el blanco de agua o ser mayor o igual a . 0.020 o menor o igual a 0.040 en orden de la validez del ensayo.
 - 4 Si el blanco de sustrato es válido, use el blanco del instrumento. Lea los controles negativos y positivos y luego las muestras. Si el blanco de sustrato no es válido repita los pasos 3 y 4 usando como alternativa otro blanco de sustrato. Si el blanco de sustrato alternativo no es válido, tendrá que repetirse toda la prueba.
 - 5 Si hay una interrupción durante la lectura de las pruebas, reblanquee el instrumento con el blanco de sustrato usando el blanco de sustrato alternativo si fuera necesario, luego continúe realizando las lecturas de las muestras

3.5 CALCULO DE LOS RESULTADOS

Usando un QUANTUM II los resultados son obtenidos automáticamente

Cálculo del valor de Cutoff

El valor de Cutoff es la media absorbancia del Control positivo de HTLV multiplicado por 0.4

Ejemplo :

PCN1 x= 1.259

$$\begin{aligned}\text{Valor del Cutoff} &= 0.4 \times \text{PCN1x} \\ &= 0.4 \times 1.259 = 0.504\end{aligned}$$

La presencia o ausencia de anticuerpos para HTLVI y/o HTLVII está determinada por la relación de la absorbancia de la muestra y el valor de Cutoff. Si la absorbancia de la muestra es mayor o igual que el valor de Cutoff se considera que existen anticuerpos para HTLV

CAPITULO IV

RESULTADOS

Se analizó para este estudio un total de 500 pacientes distribuidos de la siguiente manera:

En San Lorenzo se examinó 200 pacientes, en Borbón 150 pacientes, Mataje con 50 pacientes, en Palma Real se analizó 50 pacientes y en Anchayacu 50 pacientes (Cuadro 1)

De este total un 64.2 % corresponde al sexo masculino y el 35.8 % al sexo femenino. (Cuadro 2), con un predominio del 88 % de pobladores de raza negra y los restantes son aborígenes del sector e inmigrantes principalmente del Norte de Manabí.

En el mismo muestreo se analizó pruebas para VDRL, encontrando el siguiente resultado: 1.4 % positivos en San Lorenzo, 0.8 % en Borbón y 0.2 % en Mataje, el resto de las áreas fueron negativas para VDRL. No se analizó pruebas para HIV por los altos costos de los reactivos

En los análisis de laboratorio se encontró un solo caso de HTLV reactivo con ELISA en el sector de San Lorenzo que comprende a un paciente de raza negra, ambulatorio con manifestaciones cutáneas severas, correspondiendo al 0.2 % de nuestro universo de estudio.

El problema de la guerrilla, el narcotráfico y el Plan Colombia dificultó nuestros muestreos, los pobladores especialmente en Mataje y Palma Real se resistieron a cualquier presencia de extraños en el sector.

CAPITULO V

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿CONSTITUYE LA INFECCION POR HTLV UNA SITUACIÓN DE SALUD ENDÉMICA DEL NORTE DE ESMERALDAS?

5.1 PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

- 1 Presencia del virus HTLV/II en el norte de Esmeraldas.
- 2 Es una infección característica de la raza negra.
- 3 Está asociada a otras enfermedades de transmisión sexual.

5.2 OBJETIVOS GENERALES

Realizar la investigación en la población de la presencia del retrovirus HTLV en el norte de Esmeraldas en el periodo de Agosto a Septiembre del 2000.

5.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la prevalencia de la infección por HTLV en los siguientes sectores: San Lorenzo, Borbón, Mataje, Palma Real y Anchayacu.
2. Establecer la correlación clínica y de laboratorio en los afectados..
3. Determinar los riesgos poblacionales de Esmeraldas

5.4 VARIABLES

VARIABLES cualitativas:

Raza, ubicación, sexo

VARIABLES cuantitativas:

Edad, número de pacientes analizados

5.5 DEFINICION DE LAS VARIABLES

- A) Pacientes de raza negra y aborígenes, tanto de sexo femenino como masculino, ubicados en los sectores de San Lorenzo, Borbón, Mataje, Palma Real y Anchayacu.
- B)** Se analizó 500 pacientes con edades mayores de 25 años, de preferencia con manifestaciones cutáneas.

CAPITULO VI

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio de tipo longitudinal prospectivo, de corte sobre la determinación de anticuerpos para el retrovirus HTLV en las poblaciones de San Lorenzo, Borbón, Mataje, Palma Real y Anchayacu.

Se hizo un estudio previo de las áreas a analizarse mediante recorridos por las zonas antes mencionadas.

Se solicitó apoyo logístico a la Dirección de Sanidad naval obteniendo ayuda aérea y fluvial para la toma de muestras.

Se llevó a cabo la toma de muestras de sangre venosa para las determinaciones serológicas usando sistemas de tubos al vacío y agujas múltiples, se rotula, se deja coagular y centrifuga a 5.000 r.p.m. por 5 minutos, separando el suero y los ponemos en termos refrigerantes portátiles para su posterior congelación y su respectivo análisis.

Se utilizó la técnica de Enzimoimmunoanálisis para la realización de las pruebas para anticuerpos de HTLV.

Los análisis se llevaron a cabo de Agosto a Diciembre del 2000. Se procesaron las muestras en el laboratorio de la Dirección de Sanidad Naval.

UNIVERSO

200 pacientes de San Lorenzo, 150 pacientes de Borbón, 50 pacientes de Mataje, 50 pacientes de Palma Real y 50 pacientes de Anchayacu.

MUESTRA

Pacientes que resulten de la pesquisa para la realización de las pruebas

OBTENCION DE DATOS PRIMARIOS

La información se tomó de los diferentes informes diarios y los resultados de laboratorio

PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION

El levantamiento de texto se realiza en el procesador de palabras MS-WORD y los cuadros estadísticos se elaborarán en hoja electrónica EXCELL

Para la realización de los ensayos de laboratorio se utilizó la técnica ELISA o EIA (enzyme linked immunosorbent assay).

Para las lecturas se utilizó un equipo Quatum de Abbott con incubadora dinámica para virus y lavadores automáticos.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Los pocos estudios realizados en el Ecuador han sido dirigidos al norte de Esmeraldas, por la proximidad con zonas endémicas del sur de Colombia, estudios hechos por Calero y colaboradores, H. Romero y Garzón nos presentan unos 14 casos positivos en una población de 3000 habitantes aproximadamente, y ahora uno en 500 habitantes, todos del norte de Esmeraldas, por lo que se hace necesario considerar como una zona geográfica de riesgo en nuestro país para la infección de HTLV.

A pesar de que los porcentajes de pacientes seropositivos para HTLV en la región no son altos, debemos tener en cuenta del tipo de riesgo que presentan los retrovirus en la población mundial y considerando la forma en que se propagó de manera acelerada el virus del SIDA, a quien pertenece esta familia, pensando además que en un principio se estudiaba el virus del sida como un HTLV, pero de tipo III, podríamos suponer que al no controlar la presencia del HTLV nos encontraríamos en un futuro no muy lejano con una epidemia parecida al SIDA, debiendo trabajarse mas fuertemente en el análisis de la problemática.

CAPITULO VIII

RECOMENDACIONES

Conociendo de la existencia del virus en la región estudiada, las entidades gubernamentales de salud deberían poner énfasis en el tema, apoyándose con los organismos internacionales como la OMS y OPS, así también por el riesgo geográfico y los brotes de violencia existentes en la frontera con Colombia, recurrir a las fuerzas armadas para el apoyo logístico, el cual en nuestro trabajo fue totalmente importante.

Es necesario que se adquiera reactivos para la detección de este virus en los institutos de investigación del país, en los bancos de sangre y fomentar los estudios hacia otras regiones, donde podría existir el virus linfotrópico humano.

Hacer conciencia en los grupos de investigadores para continuar con la realización de nuevos hallazgos, debido a su exótica patología donde abarca problemas de tipo neurológicos, hematológicos, dermatológicos y de otra índole, encontrando en el HTLV una gran variedad de trabajos de investigación que se puede realizar.

Los estudios en el área de virus en la Facultad de Ciencias Químicas deberían estar más actualizados por la gran variedad de elementos patógenos nuevos encontrados en lo que va del nuevo siglo, de esta manera nuestras investigaciones serán de mas alto relieve.

