

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BUSQUEDA DE ANTICUERPOS Y PROVIRUS DE HTLV-I/II EN
POBLACION DE ALTO RIESGO Y DONADORES DE SANGRE
EN EL NORESTE DE LA REPUBLICA MEXICANA

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

PRESENTA

M.V.Z. PABLO ZAPATA BENAVIDES

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1995

TM

Z5320

FCB

1995

Z3



1020091530

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BUSQUEDA DE ANTICUERPOS Y PROVIRUS DE HTLV-I II EN
POBLACION DE ALTO RIESGO Y DONADORES DE SANGRE
EN EL NORESTE DE LA REPUBLICA MEXICANA

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

PRESENTA

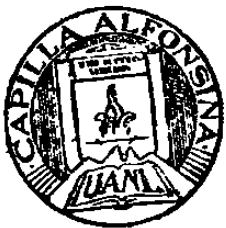
M.V.Z. PABLO ZAPATA BENAVIDES

MONTERREY, N. L.

MARZO DE 1995

0094-68860

TM
Z5320
FCB
1995
Z3



FONDO TESIS

167305

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**BUSQUEDA DE ANTICUERPOS Y PROVIRUS DE HTLV-III EN POBLACION
DE ALTO RIESGO Y DONADORES DE SANGRE EN EL NORESTE DE LA
REPUBLICA MEXICANA.**

TESIS QUE EN OPCION A TITULO

DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

M.V.Z. PABLO ZAPATA BENAVIDES

COMISION DE TESIS:

PRESIDENTE


DRA. LAURA MA. TREJO AVILA

SECRETARIO


DR. REYES TAMEZ GUERRA

VOCAL


DR. LUIS J. GALAN WONG

VOCAL


DRA. CRISTINA RODIRUGUEZ PADILLA

MONTERREY, N.L.

MARZO DEL 199

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**BUSQUEDA DE ANTICUERPOS Y PROVIRUS DE HTLV-III EN POBLACION
DE ALTO RIESGO Y DONADORES DE SANGRE EN EL NORESTE DE LA
REPUBLICA MEXICANA.**

TESIS QUE EN OPCION A TITULO

DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

M.V.Z. PABLO ZAPATA BENAVIDES

DIRECTOR



DRA. LAURA MA. TREJO AVILA

CO-DIRECTOR



DR. REYES TAMEZ GUERRA

MONTERREY, N.L.

DEDICATORIA

A DIOS: Por darme la vida y permitirme llegar hasta el fin de una de las etapas más importantes de mi vida.

Con cariño a mis padres:

Sr. Cruz Villegas Pérez por brindarme un apoyo indeterminable en cada una de las etapas de mi vida.

Sra. Juanita Benavides Almaguer por sus esfuerzos y sacrificios. por ser una mujer digna de admiración.

A mis hermanos:

Ma. de Jesús, Juanita, Mario, Carlos, Dalia, Janeth y Apolinar, por su cariño de siempre.

A mis amigos:

M.V.Z M.C. Ramiro Avalos, M.V.Z. M.C. Alfredo Wong. M.V.Z. Gabriel De León Mtz. M.V.Z. Gerardo Vargas, M.V.Z. Cesar Moreno, Lauro Quiros, Rolando Robles. Reyes López, Q.B.P. Jose Luis Méndez, M.C. Juan Manuel Aicocer, Q.B.P. Juan Fco. Contreras, Q.B.P. Eugenio Román, Q.B.P. Francisco, Q.B.P. Cesar, Q.B.P. Leonardo Castillo, Ricardo Gómez, Q.F.B. Arturo Chavéz. Q.B.P. Edgar Mendoza, Bióloga Esther Treviño, Q.B.P. Nelly, Q.B.P. Rosy Gómez. Q.B.P. Carmen Guajardo, Q.F.B. Carmen Adalid, Catarino, Bertha, Esperanza.

A mis segundos padres:

Sr. Juan Vargas y Sra. Obdula Guerrero de Vargas por sus buenos consejos y apoyo de siempre.

Y de forma muy especial a la Q.B.P. Ma. Antonieta Lara Rdz. por su excelente ejemplo de perseverancia, a quien amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Biología Molecular y Celular A.C. por el financiamiento brindado para la realización de este estudio.

Agradezco al Laboratorio de Inmunología y Virología del Depto de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. la oportunidad y facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a mi Directora de Tesis Dra. Laura Ma. Trejo Avila por sus valiosos consejos en la elaboración del trabajo.

Al Dr. Reyes Tamez Guerra y Dra. Cristina Rdz. Padilla con mucho respeto por su gran disposición y ayuda en el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Luis Galán Wong por su constante apoyo en la realización de este trabajo.

A la Q.B.P. Ma. Antonieta Lara Rdz. por su valiosa ayuda y sugerencia en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Fuentes Pensamiento por la facilidad brindada para la recolección de las muestras.

Q.B.P. Norma Nelly, Q.B.P. Edgar Mendoza, Q.B.P. José Luis Mendez, Q.B.P. José Norberto Aponte, y Q.B.P. Ma. Luisa Mendoza por su valiosa cooperación otorgada en la recolección de las muestras.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en la realización de la tesis.

***DOY GRACIAS A DIOS POR
DARME LA VIDA,
VIDA MISMA QUE ME
CONDUJO AL TERMINO DE
DE UNA ETAPA MAS EN ESTE
MUNDO VENIDERO***

M.V.Z. PABLO ZAPATA BENAVIDES

INDICE

Lista de abreviaturas.....	X
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XII
Resumen.....	1
Introducción	2
Antecedentes	
I Seroepidemiología.....	4
II Patologías asociadas al virus.....	7
III Población de alto riesgo.....	10
IV Diagnóstico de HTLV.....	11
V Características del virus.....	13
VI Mecanismos de regulación génica.....	16
VII Mecanismos de transformación leucemo/linfomagénico.....	17
Diagrama de flujo.....	19
Lista de reactivos	
A) Origen de reactivos.....	20
B) Material biológico.....	21
Metodología	
I .- Obtención de la muestra.....	22
II .-Serología.....	22

A) Aglutinación de partículas virales.....	22
B) Inmunoaderencia.....	25
C) Inmunoelctrotransferencia.....	26
III.- Aislamiento de células mononucleares.....	27
IV.- Cultivo de linfocitos.....	27
V.- Transformación de E. coli.....	28
A) Producción de bacterias calcio competente.....	28
B) Transformación.....	29
VI.- Minipreparación de plásmidos.....	29
VII.- Producción a gran escala.....	29
A) Crecimiento de bacterias.....	29
B) Lisis celular.....	29
C) Aislamiento del plásmido.....	30
IV Electroforésis	30
VII.- Extracción de DNA.....	31
VIII.- Purificación de oligonucleótidos-.....	32
XI.- Reacción de la polimerasa en cadena.....	33
RESULTADOS	
I.- Población estudiada.....	35
A) Población de alto riesgo.....	35
B) Donadores de sangre.....	28
II.- Serología	

A) Prueba de aglutinación pasiva.....	38
B) Inmunoadherencia.....	41
C) Inmunoelctrotransferencia.....	43
III.-Reacción en cadena de la polimerasa.....	46
DISCUSION.....	48
CONCLUSION.....	53
REFERENCIAS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo.
M	Concentración molar.
mM	Concentración milimolar.
N	Concentración Normal.
g	Gramos.
mg	Miligramos.
µg	Microgramos
ng	Nanogramos.
l	Litros.
ml	Mililitros.
µl	Microlitros.
hrs.	Horas.
min	Minutos.
xg	X Número de veces la fuerza de gravedad.
pH	Logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno.
pb	Pares de Bases.
°C	Grados Centígrados.
v	Voltios.
tm	Temperatura media de hibridización.
DNA	Acido Desoxiribonucleico.
RNA	Acido Ribonucleico.
pmol	Picomoles.
TE	Tris-EDTA.

LB Luria-Bertanie.

NC Nitrocelulosa.

ATLL Leucemia linfoma T de adultos.

NBT Nitroazul de tetrazolium.

BCIP 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato.

PCR Reacción en cadena de la polimerasa.

RT Transcriptasa reversa.

PA Aglutinación pasiva.

EDTA Acido etilendiamino tetra-acético.

PBS Solución balanceada de fosfatos.

TBS Solución balanceada de tris.

UA Unidad aglutinante.

BLV Virus de la leucosis bovina.

FLA Fragmento de lectura abierto.

cm₂ Centímetros cuadrados.

MEM Medio esencial minimo.

Kd Kilodaltón.

Px Región X.

Ag Antígeno.

Ac Anticuerpo.

LISTA DE FIGURAS

No.		Pag
1	Partícula viral saliendo de células linfoides	5
2	Areas endémicas a HTLV-I.....	6
3	Estructura viral.....	13
4	Mapa genético del virus.....	14
5	Esquema de regulación génica de pX.....	16
6	Diagrama de flujo.....	19
7	Procedimiento de la prueba de PA.....	23
8	Interpretación de la prueba de PA.....	24
9	Mapa genético del plásmido pHT 3.9.....	28
10	Corrimiento electroforético del plásmido pHT 3.9.....	30
11	Corrimiento electroforético de DNA.....	31
12	Características de los oligonucleótidos.....	32
13	Corrimiento electroforético de la purificación de los oligonucleótidos.....	33
14	Origen de las muestras de alto riesgo.....	36
15	Placa de PA con muestras de pacientes leucémicos.....	38
16	Placa de PA con muestras sospechosas.....	39
17	Prevalencia de HTLV-I en donadores de sangre.....	41
18	Uso de EDTA para inhibir reacciones inespecíficas.....	42
19	Inmunoadherencia de pacientes leucémicos.....	43

20	Inmunoadherencia de pacientes sospechosos.....	44
21	WB de pacientes de la región noreste del país.....	44
22	WB de pacientes del estado de Guerrero.....	45
23	WB de donadores de sangre de la zona noreste.....	45
24	PCR de las muestras sospechosas por serología de Pacientes de el Noreste de País.....	46
25	PCR de pacientes negativos de alto riesgo al virus.....	46

LISTA DE TABLAS

No.		Pag.
1	Origen de las muestras de alto riesgo a HTLV-I.....	35
2	Subpoblaciones que constituyen a la población de alto riesgo.....	36
3	Edad y sexo de la población de alto riesgo.....	37
4	Titulación de las muestras positivas a HTLV-I por PA.....	40
5	Prevalencia de donadores de sangre a HTLV-I.....	40
6	PA y WB en donadores de sangre.....	45
7	Muestras probadas por PA, IA, WB y PCR.....	47

AREA DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

RESUMEN

El Virus Linfotrófico T Humano es asociado a un amplio espectro de patologías humana: leucemias de las células T de adulto (ATL), enfermedades neurológicas crónicas como paraparesis aspástica tropical/mielopatía asociada a HTLV-I (TSP/HAM) y disfunciones en el sistema inmune. Las regiones endémicas para el virus se encuentran Japón, Sur de Italia, Africa central, el área del Caribe y los Estados Unidos, este último presenta una baja endemicidad con relación a los países antes mencionados.

Este trabajo se realizó con el fin de conocer la presencia del virus preferentemente en la región noreste del país y su distribución entre los diferentes subgrupos de alto riesgo y donadores de sangre. Por lo que se probaron 2095 muestras de suero por la prueba de PA (aglutinación pasiva). La población de estudio fue dividida principalmente en 2 grupos: Población de alto riesgo y donadores de sangre (bajo riesgo).

Se probaron 1078 individuos de la población de alto riesgo de los cuales 803 eran originarios del noreste de la República mexicana y 275 del estado de Guerrero, un paciente resultó positivo y 11 presentaron reactividad devilmente positiva a la prueba de PA, sin embargo fueron negativos a la prueba de inmunoelectrotransferencia (WB) y PCR de DNA de células mononucleares periféricas. De la población de donadores se probaron 1017, sueros de las cuales 4 fueron positivos a PA, estos se sometieron a la prueba de microtitulación , resultando 3 con títulos mayores de 1:16 unidades aglutinantes. Por la prueba de WB 2 presentaron reactividad únicamente contra la proteína *gag p19*.

Estos resultados indican que el noreste de la República y el estado de Guerrero presentan baja seroprevalencia con respecto a los resultados presentados en otros países de centro y sud América y los Estados Unidos sin embargo se requiere de un mayor numero de pacientes para conocer la prevalencia de la región.

INTRODUCCION

En la última década ha sido posible poner de manifiesto un grupo de retrovirus exógenos T linfotrópicos considerados como la mayor plaga de la segunda mitad del siglo XX. En 1978 fue aislado de 2 pacientes leucémicos el primer retrovirus humano el Virus Linfotrópico T humano (HTLV-I) por Poiesz del grupo de Robert C. Gallo, caracterizado y publicado por el mismo grupo en 1980, en 1983 fue aislado el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) de 3 pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, de acuerdo al efecto patológico los podemos clasificar en dos grupos: Los que inducen a una transformación no controlada conduciendo a malignidad formado por los Virus Linfotrópicos T Humanos (HTLV-I/II) y los que producen depleción de la células T formado por HIV-1 II.

Estos dos grupos apesar de pertenecer a dos subfamilias diferentes, (HTLV-I/II pertenecen a la subfamilia Oncovirinae y HIV-I/II a la subfamilia Lentivirinae) tienen muchas características en común como son: el tropismo por los receptores CD4 de las células T, una organización genética similar (aunque las secuencias nucleotídicas presentan homología distante) y ambos conducen a una disfunción del sistema inmune.

HTLV-I, BLV (Virus de la Leucosis Bovina) y STLV (Virus Linfotrópico de Simios) pertenecen a la misma subfamilia comparten numerosas características de infección, patología, estructura genética y estrategias de expresión sin embargo se diferencian por su rango de huésped y las células que infectan.

HTLV-I, BLV, STLV y HIV son retrovirus que se replican en las células de la respuesta inmune integrándose fortuitamente en el genoma del huésped. No poseen oncogenes pero sus productos son capaces de inducir la enfermedad después de un largo período latente.

HTLV-I es asociado a leucemias de las células T de adulto, recientemente se ha asociado y aislado de pacientes con problemas neurodegenerativos como mielopatías y paraparesis espástica tropical, además se le ha asociado en algunas etiologías de problemas psicóticos, (en animales ya se había reportado mucho antes la asociación de retrovirus con patologías neurodegenerativas).

Estudios seroepidemiológicos revelan que HTLV-I es endémico para distintas áreas geográficas del mundo como es el suroeste de Japón, Sur de Italia, Africa central, el área del Caribe y ciertas regiones de los Estados Unidos manifestando una incidencia más alta en mujeres, personas de color y con edad avanzada ,En México no se han establecido pruebas de tamizaje rutinario en donadores de sangre como en otros países además los estudios realizados con respecto a la incidencia del virus son esporádicos, por lo tanto no se ha determinado su seroprevalencia real.

Ciertas evidencias sugieren que HTLV-I puede ser transmitido por contacto sexual, transfusiones sanguíneas (y en general por la introducción de linfocitos infectados por diferentes rutas). En los Estados Unidos se ha determinado una seroprevalencia de 0.002% ,sin embargo el grado de conversión puede ser hasta del 82% en recipientes de sangre seropositiva al virus. En Japón se ha determinado una seroconversión hasta del 60 % en parejas de pacientes positivos por transmisión sexual.

El diagnóstico se basa en su mayoría por las técnicas serológicas detectando anticuerpos, las cuales nos pueden proporcionar resultados falsos negativos por las características propias de la infección. La técnica de hibridación y PCR de DNA y RNA son herramientas muy importantes como pruebas confirmatorias en el diagnóstico, detectándose secuencias vírales que en conjunción con las técnicas serológicas nos proporcionan un diagnóstico más preciso.

ANTECEDENTES

I.- SEROEPIDEMIOLOGIA

El virus linfotrópico T humano (HTLV-I) fue el primer retrovirus humano aislado por Poiesz et al en 1980 de un paciente con linfoma cutáneo de células T. (58). es un retrovirus exógeno que se replica en las células hospederas integrándose fortuitamente en el genoma del huésped, no posee oncogenes pero sus productos son capaces de inducir una transformación no controlada conduciendo a malignidad y disfunción del sistema inmune después de un largo período latente, presenta tropismo por los receptores CD4 Y CD8 de linfocitos T, el virus brota de la células presentando una simetría esférica como se muestra en la figura No 1. (20,80) Es un virus muy lábil y fácilmente es inactivado cuando entra en contacto con el medio ambiente, se transmite por medio de líquidos y tejidos biológicos conteniendo linfocitos T infectados (24) se transmite por vía vertical de madre a hijos a través de leche materna (26) o por rompimiento del cordón umbilical al momento del parto (66) y por vía horizontal a través de transfusiones sanguíneas (81), agujas contaminadas con sangre infectada principalmente en drogadictos (62) y por contacto sexual de hombre a mujer, de hombre a hombre y raramente de mujer a hombre (78) .

No se conoce la cantidad de sangre o células necesarias para causar una infección sin embargo se ha estimado que la mínima cantidad de sangre para la seroconversión en conejo es de 10 µl lo cual equivale aproximadamente a 1.7×10^4 linfocitos (38) y para la transmisión por leche materna o semen de personas seropositivas a conejo es de 5×10^6 o menos (30).

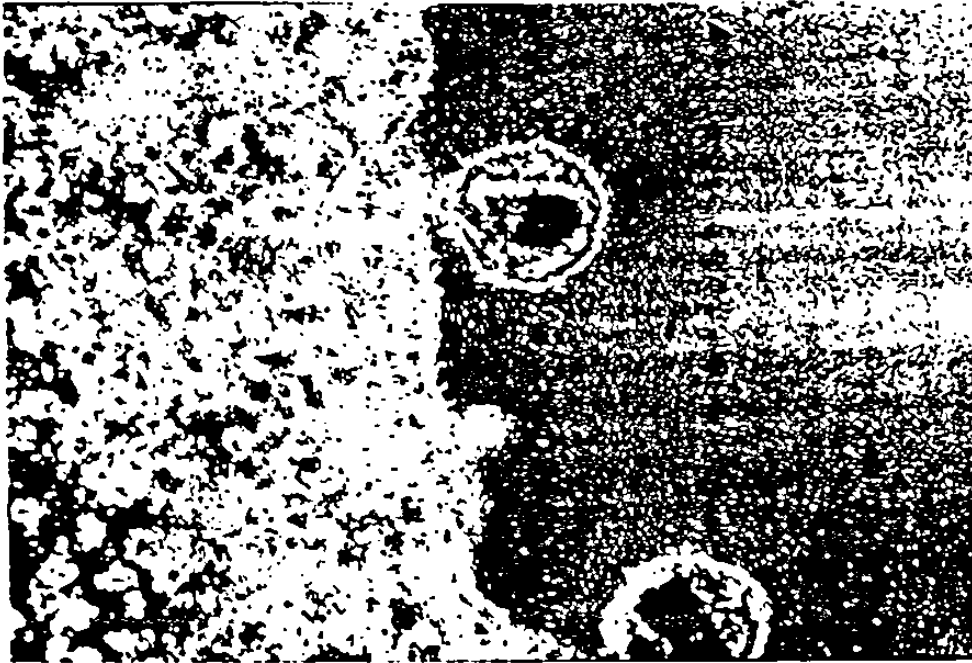


Fig. 1.- Fotografía del virus durante el período de gemación

HTLV-I es endémico en distintas áreas geográficas del mundo (fig. 2.) originalmente se asoció con leucemias de las células T en Japón, estudios subsecuentes revelaron otras áreas endémicas al virus en las Islas del Caribe, Africa Central , Sur de Italia (80) y más recientemente en Sudamérica e Islas del Pacífico Sur donde se detectaron seroprevalencias elevadas entre los aborígenes nativos de estas áreas (7). Además de las leucemias de células T el virus fue asociado con procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central. en Japón se les denominó Mielopatías asociadas a HTLV-I (HAM) y en el Caribe y Sudamérica paraparesis espástica tropical (80). Los estudios seroepidemiológicos revelan que la

incidencia es más alta en mujeres, personas de color (3,37,80) y se incrementa proporcionalmente con la edad.

La prevalencia de anticuerpos en la población de las Islas del Caribe es de 3 a 4 % incrementándose hasta en un 33 % en personas de edad avanzada (60 a 90 años): en Japón es de 3 a 7 % presentando una marcada diferencia entre una región y otra por ejemplo la Isla de Heteruma presentan una prevalencia de 21.2 % mientras que la Isla Taketomi presenta 6.2% (37), algo similar se presenta en Panamá. Los Estados Unidos área de baja endemicidad presenta una seroprevalencia de 0.025% en donadores de sangre. Taiwan presenta 4.81 seropositivos por cada 1000 habitantes (34) y en Europa particularmente Francia e Inglaterra los pacientes con leucemias de células T de adulto son inmigrantes de áreas endémicas.

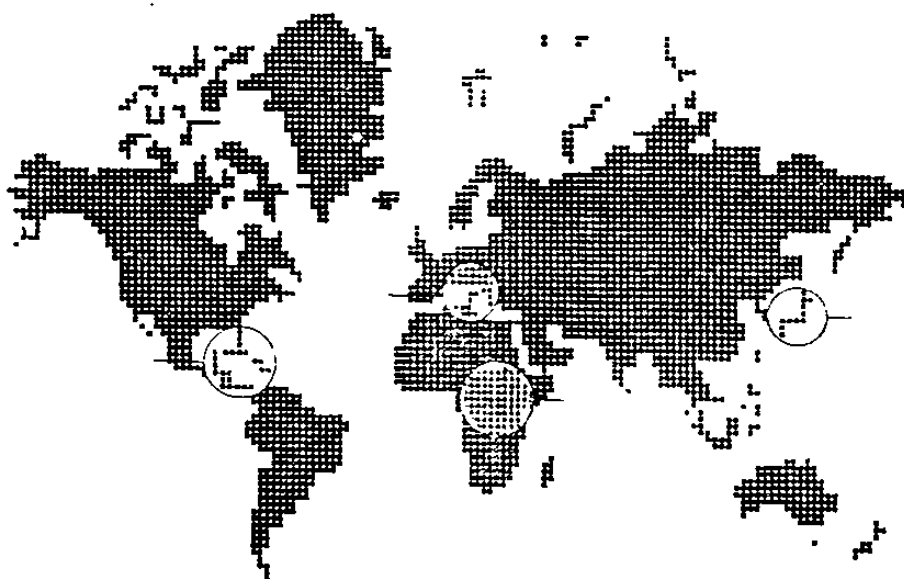


Fig.No. 2 Areas endémicas para HTLV - I

II PATOLOGIAS ASOCIADAS AL VIRUS

HTLV-1 ASOCIADO A LEUCEMIAS/LINFOMAS.

Alrededor de 80 al 100 % de los pacientes con leucemias/ linfomas de las células T de adulto (ATLL) reaccionan positivamente con las proteínas del virus, ATLL es considerada como la neoplasia más maligna de los linfocitos T y más común en Japón y en el área del Caribe caracterizada por la proliferación de linfocitos CD4 y CD8 con manifestaciones clínicas como hipergamaglobulinemia, hipercalcemia, linfadenopatía, pleomorfismo lobulado de células T de sangre periférica y lesiones cutáneas (14,20,33). En Jamaica se ha reportado una alta frecuencia (56.7 %) de asociación por serología y estudios moleculares de HTLV-I con linfoma no hodgkin's.(14)

HTLV-1 ASOCIADO A PROBLEMAS NEUROLOGICOS.

En el Caribe, Africa y Sur de los Estados Unidos HTLV-I es asociado con mielopatías y en Japón con neuropatías (5,32,59). Una alta incidencia de focos de paraparesis espástica tropical asociados al virus ha sido reportada en Colombia , Jamaica y Brasil, el 1 % de los individuos seropositivos desarrollan problemas cerebrales en los que se han encontrado altos niveles de anticuerpos en suero y fluido cerebro espinal (9,18) con pérdida sensorial, disfunción de la vejiga, dificultad para hablar, debilidad y dolor en las extremidades inferiores. También se a asociado a esclerosis múltiple (57, 59), sin embargo no se han encontrado evidencias claras que demuestren tal asociación (55).

HTLV-I ASOCIADO A OTRAS PATOLOGIAS Y AGENTES OPORTUNISTAS.

En las áreas endémicas se presenta un alto grado de seroprevalencia a HTLV-I, no obstante son pocos los casos clínicos reportados, el virus es capaz de provocar una inmunodeficiencia que permita infecciones oportunistas creando diferentes patologías.

A) HTLV-I ASOCIADO A OTRAS MALIGNIDADES NO ATLL. Diversas malignidades a menudo ocurren en pacientes ATLL-HTLV-I, además se han asociado otros tipos de cáncer con el virus en áreas endémicas. Asou et al. (1986) determinaron una seroprevalencia de 15.48 % en 394 pacientes con diversas malignidades sin transfusiones sanguíneas previas y 26.12% en 291 pacientes politransfundidos (6) . Matsuzaki et al. detectaron el provirus en células carcinogénicas de pulmón de un paciente que presentaba altos niveles del receptor de la interleucina 2 en circulación (46) y Gessain et al. lo detectaron en la biopsia de placas cutáneas y nódulos con infiltración de células T pero no en sangre periférica (25). La posibilidad de la infección de HTLV-I como un agente oportunista es muy remota por su mecanismo de transmisión, así que la alta seroprevalencia de HTLV-I/II con malignidades sugiere que estas ocurren asociadas a la infección misma. HTLV-I ha sido encontrado en células endoteliales in vivo e in vitro por lo tanto la posibilidad de una oncogénesis directa con otras malignidades no ATLL no puede ser descartada (15), ésta probablemente provocada por la disfunción del sistema inmune y/o por los productos del gen *pX*.

Se han realizado algunos trabajos con el efecto patobiológico de los productos del gen *pX* de HTLV-I en ratas transgénicas y se ha postulado que estos productos activan la expresión de los genes celulares que conducen a la transformación. (22,27)

B) HTLV-I ASOCIADO A LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO (LES).

LES es una enfermedad de etiología desconocida que manifiesta anormalidades en tejido y en la respuesta inmune, la cual es endémica para la región del Caribe y Africa. la asociación con HTLV-I es un tema controversial ya que mientras algunos investigadores la apoyan otros afirman lo contrario ya que muestran en áreas endémicas la misma relación de seropositividad en pacientes con LES y la población en general.

C) HTLV-I ASOCIADO A INFESTACIONES MASIVAS DE STRONGILOIDES. En áreas endémicas se han encontrado pacientes con infestaciones masivas de strongiloides y serología positiva al virus. Debido al efecto inmunosupresor del parásito se piensa que este probablemente sea un cofactor en la replicación viral (57).

D) HTLV-I ASOCIADO A HIV.- La acción conjunta de HIV/HTLV-I-II ha sido estudiada en poblaciones de alto riesgo. Manca etal. (1990) encontraron 20.8 % (5 de 24 pacientes positivos a HIV) de asociación entre los dos virus en una población de 318 pacientes sífilíticos (42) mientras que Cortez et al. encontraron la presencia de los 2 virus en un rango de 1 a 11 % entre los diferentes subgrupos de una población de pacientes con SIDA y de alto riesgo(15). Los estudios moleculares revelan que HTLV-I tiene la capacidad de incrementar notablemente la expresión de HIV reduciendo el período latente e incrementando la severidad de la enfermedad. (6)

Además de las asociaciones antes señaladas, HTLV-I ha sido encontrado en pacientes con poliartritis, y asociado con otros microorganismos tales como Borrelia , Epstein Bar, Pneumocistis carinii, sífilis, gonorrea y estreptococos o estafilococos en lesiones cutáneas. (44, 57)

III POBLACION DE ALTO RIESGO PARA HTLV-I/II

A) POBLACION DE ALTO RIESGO A SIDA. Una gran proporción de individuos infectados con HIV son también infectados con HTLV-I o II. En los últimos años se ha encontrado una seroprevalencia incrementada (7 a 50 %). en esta población de alto riesgo.

En consumidores de drogas intravenosas la seroprevalencia para HIV es un problema muy fuerte mientras que para HTLV-I lo es en menor proporción (46 % HIV y 9 % HTLV-I en Nueva York y 32 % HIV 6.6 % HTLV-I en Italia) (76) Sin embargo en esta población la seroprevalencia de HTLV-II se incrementa con respecto a HTLV-I (HTLV-II 18 % y HTLV-I 9 % en N.Y.), HTLV-II es poco común en otras poblaciones de riesgo (62).

En la población homosexual de Trinidad donde HTLV-I es endémico se ha incrementado hasta 6 veces (15 %) comparado con la población heterosexual (2.2 %). En Jamaica en una población de 125 homosexuales el 5 % resultaron positivos para HTLV-I y 10 % para HIV (50), y en los Estados Unidos Angela Mans (1988) encontró de 15 a 30 % de anticuerpos contra HTLV-I en homosexuales y bisexuales con linfadenitis generalizada y SIDA (27).

B) POBLACION TRASFUNDIDA. En áreas endémicas la seroconversión de HTLV-I después de la transfusión de componentes de la sangre ha sido observada hasta en el 60 % de los casos, así por ejemplo en 1990 Oliver Gout reportó un caso de mielopatía subaguda en un hombre de 41 años de edad que vivía en un área no endémica 18 semanas después de la transfusión sanguínea; de los 59 donadores uno era positivo y se comportaba como portador asintomático (25). El corto tiempo entre las transfusiones y la manifestación clínica puede ser debido a la inmunosupresión a que son sometidos los pacientes y al alto inoculo viral (81).

C) HTLV-I INTRAFAMILIAR. Varios grupos han reportado la presencia de anticuerpos para HTLV-1 en los miembros de las familias de pacientes seropositivos (5,14.63), en áreas endémicas donde la prevalencia en la población normal es de 12 % los miembros de las familias de estos pacientes presentan una prevalencia del 48 % manifestándose con frecuencia en los esposos de los pacientes probablemente por un intercambio sexual no protegido. En Japón se estimó que la transmisión de un cónyuge a otro es de 61 % en un período de 10 años. (58) y se ha estimado que los miembros jóvenes de la familia (menores de 20 años) presentan una prevalencia baja similar a la de la población normal, (5. 63).

IV DIAGNOSTICO DE HTLV-I. El diagnóstico se realiza por métodos serológicos y moleculares.

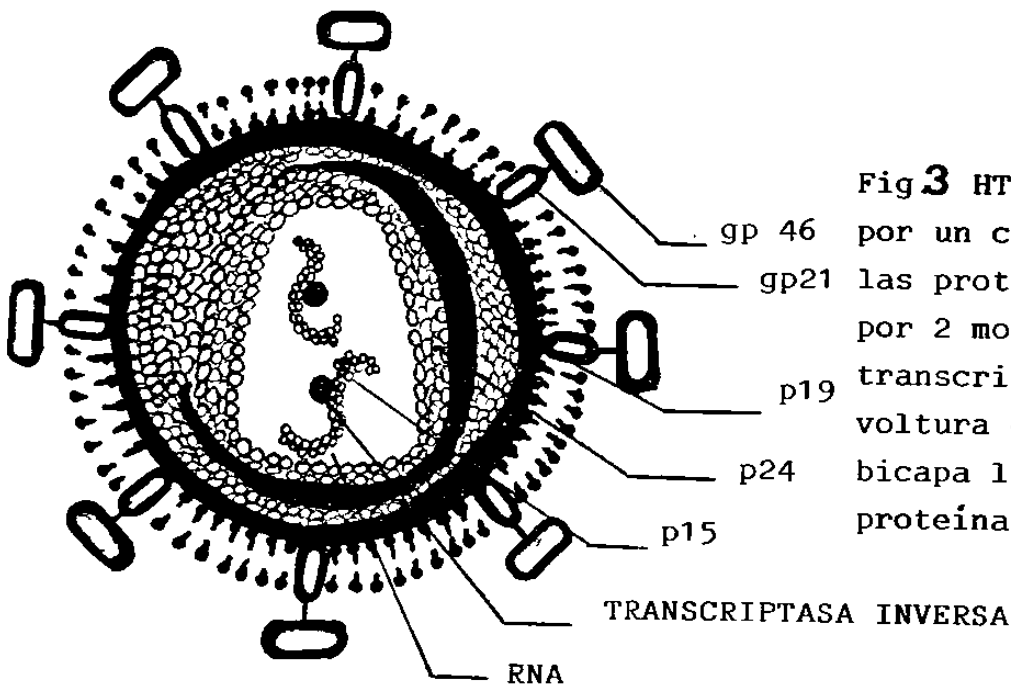
A) METODOS SEROLOGICOS - Los métodos de tamizaje son importantes para la detección de portadores asintomáticos por su potencial de transmisión a través del contacto sexual y transfusiones sanguíneas. Las pruebas de tamizaje más ampliamente utilizadas son el ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) y el ensayo de partículas aglutinantes (PA) en 1988 Kobayashi reportó que aunque tienen poca especificidad PA tiene mayor sensibilidad que una prueba de ELISA y que la inmunofluorescencia que es utilizada como prueba confirmatoria por su capacidad para detectar IgG e IgM (62). En este mismo año Wihte et al reportaron una sensibilidad de 96.9 % para la prueba de inmunofluorescencia, 92 % para radioinmuno ensayo, 97% para ELISA y 100% para PA y una especificidad de 94.3%. 98.9%, 98.8% y 96.3% respectivamente (79). Las pruebas confirmatorias se realizan por Inmunofluorescencia, Radioinmunoprecipitación (RIP) y Western blot (W B) (60 ,80). Anderson et al (1989) observaron una mayor sensibilidad del WB para el anticuerpo p24 mientras que RIP fue significativamente más sensible para la Gp51 (1). La Organización Panamericana de la Salud

recomienda para el reconocimiento de los pacientes positivos la observación como mínimo de dos antígenos, el p24 del gen *gag* y el producto del gen *env* 46 o 21 (17).

B)METODOS MOLECULARES.- La necesidad de pruebas más específicas y sensibles que resuelvan los problemas de las técnicas serológicas (falsos positivos, falsos negativos y seroindeterminados) ha llevado a la utilización de pruebas moleculares para la detección del provirus como son: Southern blot ampliamente utilizado como prueba confirmatoria para la detección del provirus en el DNA. Las secuencias génicas más utilizadas como sonda son las *LTR*, y *pol* por ser las secuencias más conservadas y la región *px* por ser secuencia única de este grupo viral, en la hibridación algunos investigadores han utilizado oligonucleótidos como sonda (marcada con P^{32} o con material no radioactivo) debido a que uno de los principales problemas en la utilización de la secuencia génica de DNA es la carencia de condiciones bien descritas como son temperatura y concentración de sales para la hibridación a diferente astringencia. Recientemente se ha utilizado la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación y detección del genoma viral como prueba diagnóstica confirmatoria y para la detección de virus defectivos en pacientes ATLL (45), y en pacientes seroindeterminados. (28)

CARACTERISTICAS DEL VIRUS

El virus linfotrópico T humano es clasificado dentro de la familia Retroviridae, subfamilia Oncovirinae, posee una nucleocápside de simetría icosaédrica con una envoltura de conformación irregular que es tomada de la célula durante el período de gemación, presenta espículas de naturaleza glicoproteica codificadas por el genoma viral, además posee un núcleo electrodenso que lo clasifica como un retrovirus del tipo C, su diámetro oscila entre los 90 y 140 nm (67)



El genoma viral esta constituido por dos moléculas idénticas de RNA de una sola cadena con polaridad positiva de 9,032 pb anatomizado del extremo 5' al 3' terminal por los siguientes locus genéticos, LTR-Gag-Pol-Env-Px-LTR. Como se muestra en la figura 4.

HTLV-I

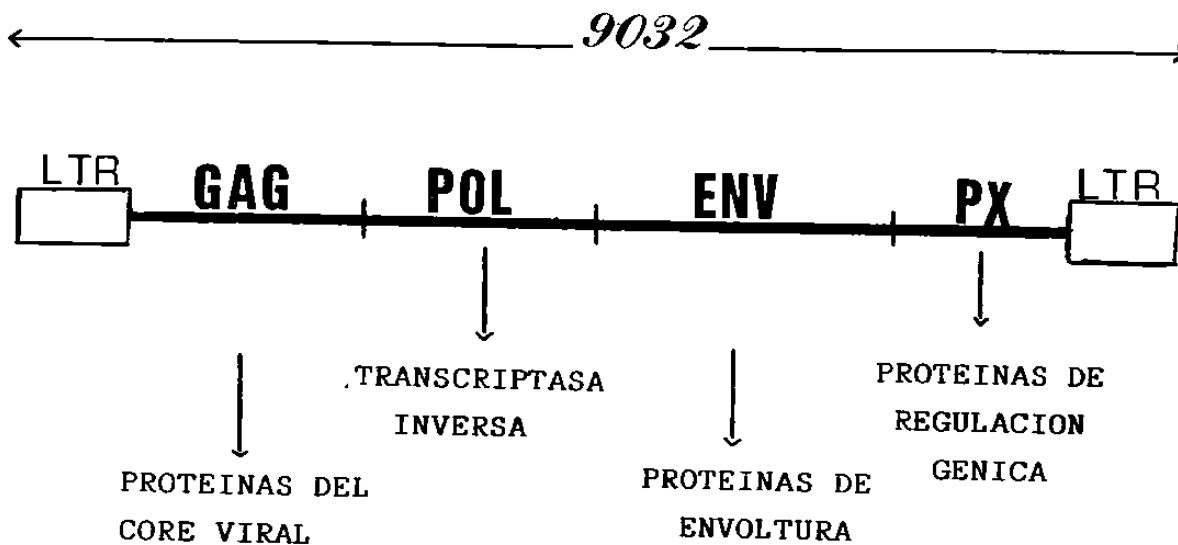


Fig. N o. 4 Estructura genética de HTLV-I/II

LTR (long terminal repeat) juega un papel importante en la integración del provirus en el genoma del huésped y en la regulación de la partículas vírales por medio de elementos enhancer que incrementen eficientemente la transcripción de los genes vírales y celulares vecinos. Esta constituido por 75 pb y flanqueado por 6 pb repetidos de DNA celular. Cada LTR contiene las secuencias U3-R-U5 (43,62,67,70).

Gag codifica para las proteínas estructurales iniciando en el codón ATG en la posición 82 y termina con TAA en la posición 2,089 codificando un precursor de 53 kd que a través de un proceso de maduración da origen del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal NH₂-p19-p24-p15-COOH, la p24 y p19 son fácilmente detectadas con las pruebas confirmatorias de Western blot (43, 62,67,70).

Pol es el gen que esta localizado inmediatamente después del gen Gag y es transcrito como una poliproteína gag-pol que codifica para 896 aminoácidos originando a un precursor de 99 kd que a su vez da origen a la transcriptasa inversa y a la endonucleasa (13,67).

Env codifica un precursor proteico de 488 kd el cual inicia en la posición 5,180 y termina en la posición 6,644 pb. Después de un proceso de glicosilación se divide en una glicoproteína (gp) externa de 46 kd y una gp de 21 kd transmembranal. Las proteínas de envoltura son los primeros antígenos vírales reconocidos por anticuerpos del suero de pacientes infectados (13,67).

Px es el gen que se encuentra entre el gen env y el extremo 3' LTR, es transcrito en un RNA mensajero de 2.1 kd que codifica para las proteínas p40x, p27x y la p21x que son traslapadas y generadas por un evento de maduración doble. Las 3 proteínas son transcritas en diferentes codones de iniciación y fragmentos de lectura abierta (ORF) (43,51,70).

MECANISMOS DE REGULACION GENICA

Los mecanismos de regulación génica de HTLV-I son controlados por las proteínas transactivadoras *TAX* y *REX*, y las secuencias promotoras de los LTR

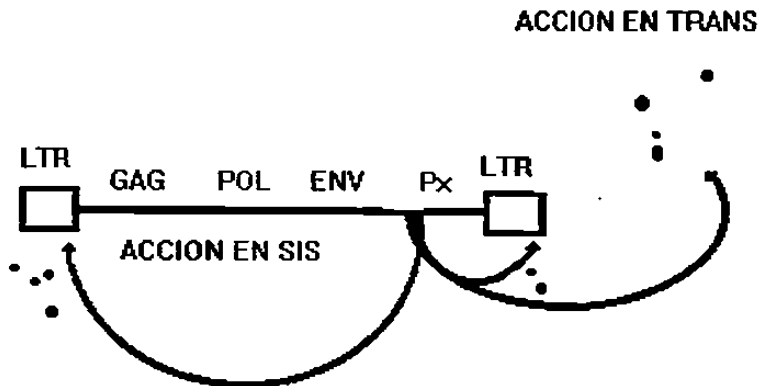


Fig. No. 5 Mecanismo de acción en trans de los productos del gen pX sobre los genes virales y celulares

REX o p27 es una proteína post-trascricional localizada predominantemente en el núcleo, la porción NH₂ terminal presenta una secuencia altamente básica de 20 aminoácidos que son suficientes para reconocer la maquinaria de transporte nuclear. esta proteína es esencial para la acumulación de RNAm del gen *gag* y *env* que conduce a la expresión de las proteínas estructurales del virión (51,70,77).

La regulación de *REX* requiere de elementos de acción en cis en la molécula de RNA denominados RXE (elementos responsables de rex). Cuya función es probablemente activar el transporte nuclear del RNAm, presentando una regulación semejante al virus de la leucosis bovina, y al de la inmunodeficiencia humana, e in vitro regula la expresión del RNAm de HIV (77).

TAX es una fosfoproteína nuclear de 40 kd considerada como un potente transactivador de las secuencias enhancer localizadas en los LTR. Se ha demostrado que TAX no interactúa directamente con los elementos responsables de tax (TRE) pero proteínas celulares median la respuesta de TAX (12,51,70,73).

El elemento responsable de TAX (TRE) esta constituido de tres secuencias de 21 pb repetidas (GAAGGCTCTGACCTCTCCCC) el cual contiene un CORE 5'-TGACG-3' que es esencial para la activación transcripcional por TAX y algunos factores celulares. (6,41,64,67,70,). La segunda secuencia responsable de TAX, se localiza entre las tres secuencias de 21 pb y esta constituida por 47 nucleótidos que son importantes para la expresión de genes virales. TAX activa a estas secuencias probablemente por una interacción proteína-proteína, de esta manera TAX se une indirectamente a las secuencias enhancer para mediar una respuesta sobre una secuencia específica por la interacción de complejos proteicos (15).

MECANISMOS DE TRANSFORMACION LEUCEMO/LINFOMAGENICOS

La función transactivadora de la p40x desempeña el papel central en la transformación celular o leucemogénesis activando genes que regulan el crecimiento celular. TAX puede activar genes virales y celulares tales como SV40, HIV, adenovirus, HTLV-1, IL-2R, IL-3, IL-4, c-fos8 y c-ras, vementina y HLA en células gliales (11,21,24,41,49,52,60)

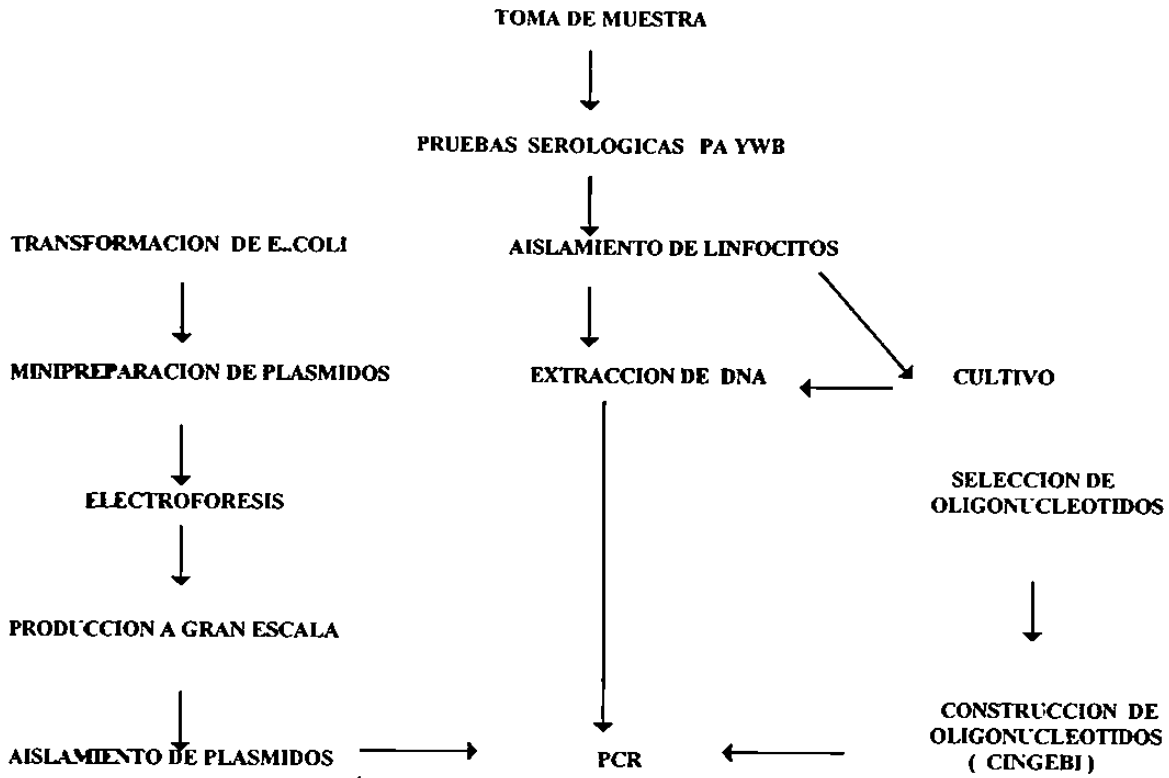
Transactivación del IL-2R. TAX presenta un efecto similar a los efectos que ocurren en la activación por mitógenos y ésteres de phorbol que estimulan la síntesis y segregación de IL-2R. Muchos genes son regulados por factores de crecimiento que interactúan como receptores específicos para inducir procesos intracelulares como la activación de la proteína kinasa C y un incremento en la movilidad de calcio que son usados en los procesos de traducción en muchas células. mecanismo probablemente usado por IL-2R (8,14,24)

Activación de GM-CSF. El factor estimulador de las colonias granulocito-macrófago. Es una proteína que no esta directamente involucrada con la transformación pero realiza una gran cantidad de efectos biológicos fundamentalmente involucrados en la diferenciación, proliferación y actividad funcional de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. la cual es activada por los

productos del gen P_x, que en su extremo 5' contiene dos elementos regulatorios que determinan la respuesta de TAX. Células de ratas transgénicas que acarrean el gen tax-HTLV-1 y líneas derivadas de éstas expresan altos niveles de proteínas tax, IL-2R y GM-CSF (49).

Activación de oncogenes. No han sido estudiados en detalle los efectos de tax en genes endógenos. Nogata y col. observaron los efectos de p40 en la expresión de proto-oncogenes involucrados en el crecimiento celular, c-fos fue significativamente incrementado por la expresión de p40 mientras los niveles de RNAm de los proto-oncogenes c-myc, c-myb y c-jun no fueron afectados por la presencia de p40. Ciertas evidencias han demostrado que los productos de c-fos son implicados en el crecimiento, diferenciación y desarrollo celular y la sobreproducción de este trae como consecuencia la transformación de fibroblastos. El oncogen Ras coopera con Tax para inducir transformación neoplásica en diferentes tipos de células (45,60).

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIALES

A.- ORIGEN DE REACTIVOS:

Se obtuvo:

De **Sigma Chemical Company** (Saint Louis, Missouri, E. U. A.): Extracto de levadura, cloruro de sodio, agar-agar, glicerol, ampicilina, cloruro de calcio, cloruro de cesio, trizma base, ácido etilendiamino tetraacético disódico dihidratado, (EDTA), persulfato de amonio, acetato de sodio trihidratado, dodecil sulfato de sodio (SDS), azul de bromofenol, bromuro de etidio, β -mercapto etanol, glucosa, lisozima. RNAsa pancreática (RNAsa A), tritón X-100, sacarosa, ácido bórico, acrilamida, acetato de amonio, acetato de magnesio, fenol, bisacrilamida, xilene cianol.

Difco Laboratories Detroit: Triptona, casaminoácidos.

Productos Químicos Monterrey, S. A.: Hidróxido de sodio, citrato de sodio. cloroformo, alcohol etílico, ácido acético glacial, alcohol isoamílico, ácido clorhídrico.

Kit SERODIA-HTLV-I/II de FUJIREBIO INC, TOKIO 161, Japón, para la detección de HTLV-I/II.

Kit de Western Blot de **BIOTECH RESEARCH LABS, INC.** para la detección de HTLV-I/II.

KIT DE PCR. GIBCO BRL. ACCESULAB S.A

MATERIAL BIOLÓGICO:

Muestras

Las muestras fueron proporcionadas por:

- 1) Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL
- 2) Hospital de altas especialidades No.25 del I.M.S.S. Monterrey N.L.
- 3) Clínica del Seguro Social de Chilpancingo Gro.
- 4) Hospital regional de la sección 50 del S.N.T.E. Monterrey N.L.

El plásmido pHT (3.9) fue proporcionado por el Dr. Kunitada Shimoto del Instituto Nacional de Cáncer de Tokio Japón

Escherichia coli, Cepa C600, HB101 Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

MATERIAL Y METODO

OBTENCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

I.- Obtención de las muestras

Se colectaron en 2 tubos vacutainer 5 ml de sangre periférica con y sin anticoagulante de la población de alto riesgo y de los donadores de sangre, posteriormente se procedió a realizar la separación de suero para las pruebas serológicas y la purificación de linfocitos para el cultivo celular y la extracción de DNA.

II.- Serología:

Los sueros fueron probados por la técnica de Aglutinación Pasiva de partículas virales (PA), usando el kit comercial SERODIA HTLV-I/II y las muestras positivas fueron confirmadas por la prueba de western-blot.

Componentes del equipo SERODIA HTLV-I

- 1.- Solución reconstituyente: se usó para reconstituir las partículas no sensibilizadas y sensibilizadas.
- 2.- Diluyente de suero: se usó para diluir el suero problema.
- 3.- Partículas no sensibilizadas: se usa como control para verificar la aglutinación inespecífica.
- 4.- Partículas sensibilizadas: son partículas de gelatina sensibilizadas con antígenos de HTLV-I.
- 5.- Control positivo: Suero de conejo con un título de 1:64 cuando se ensaya en las mismas condiciones que los sueros problemas.

El procedimiento cualitativo de la prueba de aglutinación pasiva para la detección de anticuerpos anti-HTLV-I. fue realizado de acuerdo al instructivo del kit como lo muestra la fig. No. 7.

1.- Se colocó una gota (25 μ l) de diluyente del suero en los pozos 1 hasta el 3 usando un pipetor calibrado.

2.- Se tomaron 25 μ l del suero problema y se depositaron en el pozo 1, se mezcló perfectamente, 25 μ l de esta primera dilución se pasaron al pozo 2, se mezcló perfectamente y se repitió este procedimiento en el pozo 3 para tener una dilución 1:8.

3.- Se agregó una gota (25 μ l) de partículas no sensibilizadas al pozo 2 y una gota (25 μ l) de partículas sensibilizadas en el pozo 3, lo que nos dio una dilución de 1: 8 y 1:16 respectivamente.

4.- Se mezcló el contenido de los pozos suavemente, se cubrió la placa para evitar la evaporación de los reactivos, se dejó reposar en una superficie plana a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura. Fig. No. 8.

Fig. 7.- Procedimiento de la prueba de PA de acuerdo al KIT comercial de SERODIA para la detección de anticuerpo contra HTLV-I/II

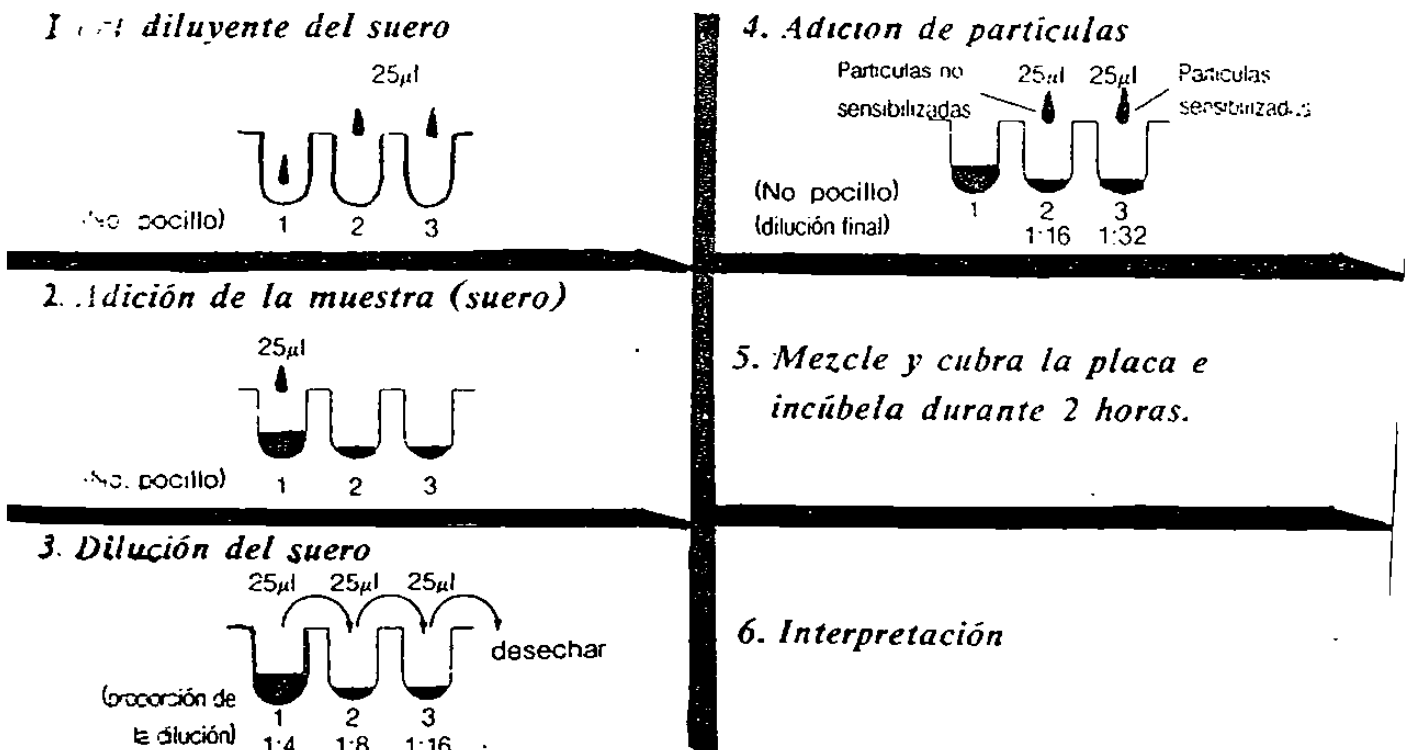
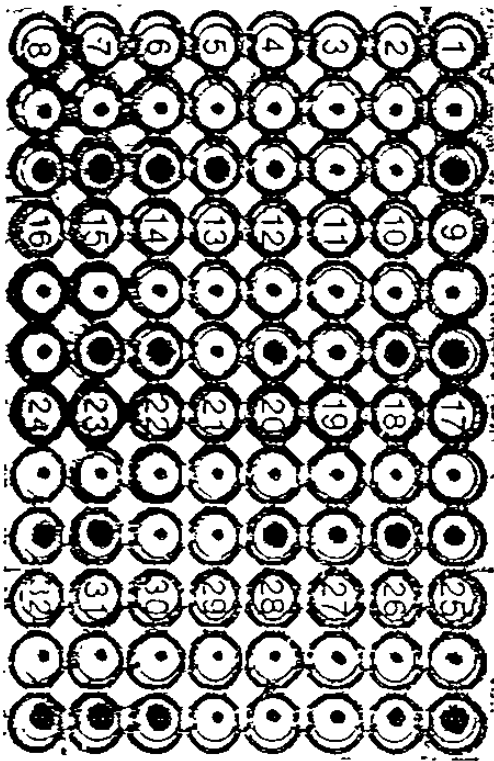


Fig. 8.- Patrones de aglutinación para la interpretación de la prueba de PA.



Muestra No.
Partículas no sensibilizadas
Partículas sensibilizadas
Muestra No.
Partículas no sensibilizadas
Partículas sensibilizadas
Muestra No.
Partículas no sensibilizadas
Partículas sensibilizadas
Muestra No.
Partículas no sensibilizadas
Partículas sensibilizadas

Procedimiento de absorción del suero.

Los sueros problemas que aglutinaron con las partículas no sensibilizadas se volvieron a analizar después del procedimiento de absorción.

Se colocó en un tubo eppendorff 300 μ l de partículas no sensibilizadas y 100 μ l de suero problema, se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos, se centrifugó 5 minutos a 2000 r.p.m. después de este procedimiento se realizó la técnica estándar, pero en este caso se partió de una dilución de 1:4 para obtener posteriormente las diluciones 1:8 y 1:16 a las cuales se le agregó partículas no sensibilizadas y sensibilizadas respectivamente.

Microtitulación

A las muestras que resultaron positivas en la prueba de tamizaje, se les realizó la prueba de microtitulación. Se partió de una dilución de 1:8 hasta una dilución de 1:512 y se le agregó a cada una 25 μ l de partículas sensibilizadas. La interpretación de los resultados se realizó de la misma forma que en la prueba cualitativa.

INMUNOADHERENCIA

1.- Se realizó la fijación de las muestras y controles en una membrana de nitrocelulosa (MNC) previamente humedecida con TBS 1X Ph 7.5 y semi seca a temperatura ambiente.

2.- La MNC fue bloqueada durante 1 hr. con una solución de TBS 1X con 25 % de leche descremada.

3.- Se le adicionó una solución de 1:5,000 de antígeno HTLV-I adherido a partículas de gelatina en solución bloqueadora (25 % de leche descremada en TBS 1X) y se dejó incubar durante 12 hrs. a temperatura ambiente.

4.- Se lavó la MNC en 3 ocasiones de 10 min. cada uno con TBS 1X.

5.- La MNC se incubó con anticuerpo anti-HTLV-I/II en una dilución de 1:500 producido en conejo durante 1 hr.

6.- Se repitió el paso No. 4.

7.- Se incubó la MNC con un conjugado de fosfatasa alcalina anti-IgG de conejo en una dilución de 1:5,000 durante 1 hr. con agitación lenta.

8.- Se depositó la MNC en una solución de BCIP y NBT en una concentración de 0.16 y 0.33 mg/ml respectivamente hasta que las bandas fueron visualizadas.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Componentes del kit de WB.

- 1.- Tiras de nitrocelulosa: Contiene el antígeno viral, separado con SDS PAGE.
- 2.- Suero control: a) No reactivo, b) control fuertemente positivo.
- 3.- Solución de bloqueo (10X)
- 4.- Solución de lavado (20X)
- 5.- Conjugado No.1: Anti-IgG-humana de cabra marcada con biotina 6.- Conjugado No.2: Peroxidasa de rábano picante con avidina 7.- Substrato A: Solución de 4 cloro naftol.
- 8.- Substrato B: Solución de peróxido de hidrógeno.
- 9.- polvo "blotting" : Leche en polvo sin grasa.
- 10.-Charola de incubación.

Procedimiento de la prueba

- 1.- Se tomaron 10 tiras de nitroceluosa y se colocaron en la charola de plástico una tira por canal.
- 2.- A cada canal se le adicionaron 2 ml de solución de lavado y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de este período se retiró la solución.
- 3.- Se le agregó posteriormente a cada canal 2 ml de solución de bloqueo al 1 X con 4 % de leche descremada y se dejó incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 4.- En los canales 1 y 2 se colocaron los controles positivo y negativo respectivamente y los sueros problema en el resto de los canales, fueron incubados toda la noche a temperatura ambiente con agitación lenta y continúa.
- 5.- Se eliminó la muestra cuidadosamente de cada canal con una pipeta pasteur y se depositó en un recipiente que contenía cloro al 10 %.
- 6.- Se lavaron 2 veces, 5 minutos cada lavado.

- 7.- Se adicionaron 2 ml de conjugado 1 en una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo y se incubó por 1 hora.
- 8.- Se lavaron las tiras 3 veces por 5 minutos cada una.
- 9.- Se agregó el conjugado 2 y se manejó en las mismas condiciones que el conjugado 1.
- 10.-Se lavaron las tiras tres veces durante 5 minutos
- 11.-Se agregaron 2 ml de solución de sustrato que fue preparada mezclando volúmenes iguales del sustrato A y B, se dejó incubar hasta la aparición de las bandas.
- 12.-La reacción cromogénica fue interrumpida con agua bidestilada.

II.- Aislamiento de células mononucleares:

Se colocaron 3 ml de ficoll hypaque en un tubo de 10 ml estéril y se le adicionó 4 ml de sangre (la cual contenía EDTA 5 mM) lentamente sin mezclar las fases, fue centrifugada a 400 xg por 40 min. a 25 C, se tomó la interfase y se lavó con solución salina fisiológica. Los linfocitos aislados fueron cultivados.

III.- Cultivo de linfocitos:

Los linfocitos aislados fueron cultivados en medio McCoy's con 10 ml de suero fetal bovino, PES (penicilina-estreptomicina) y 5 mg/ml de concanavalina en cajas de 25 cm² a 37°C y 5 % de CO₂, a los 10 días de cultivo las células fueron lisadas para la obtención de DNA. y el sobrenadante fue precipitado por toda la noche a 4°C con 8 % de polietilen glicol posteriormente fueron centrifugados a 14,000 r.p.m. por 30 minutos, el sobrenadante fue removido y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente ser resuspendida con 200 ml de agua tridestilada.

V.- Transformación de E.coli HB-101 con pHT-1 (M) 13.9 la características del plásmido son proporcionadas en la fig. No. 9

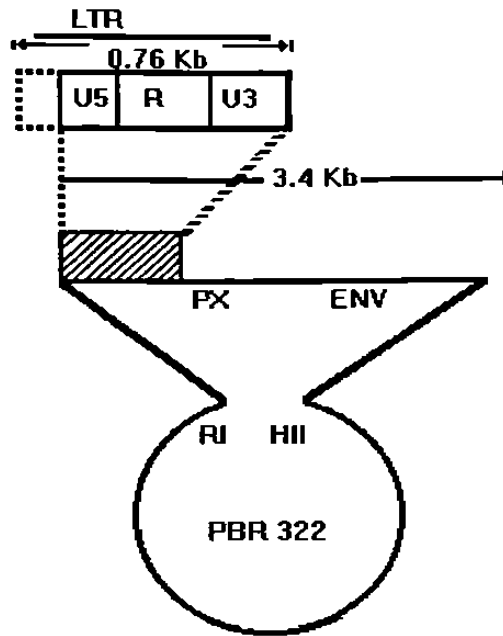


Figura No. 9.- Plásmido pHT- (M) 13.9 de HTLV-I. El plásmido 322 en el sitio de corte EcoRI contiene una región de 3.9 kb con las secuencias LTR, PX, y ENV.

a) Formación de bacterias calcio competentes.

Se inocularon 5 ml de medio LB (Luria-Bertani) con bacterias que crecieron durante toda la noche, un ml de cultivo se inoculó en 100 ml de medio LB nuevo incubándose con agitación vigorosa (200 r.p.m.) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 de absorbancia a 550 nm, inmediatamente después el crecimiento se interrumpió enfriando en hielo durante 10 minutos, se centrifugó y el paquete obtenido se resuspendió en una solución hipotónica de CaCl₂ a una concentración de 0.1 M, se prepararon alícuotas, algunas fueron utilizadas el mismo día y otras congeladas para su uso posterior.

b) Transformación:

Se preparó una mezcla de 7 μ l de una solución de plásmidos en buffer TE (Tris-HCl- EDTA) a una concentración de 1 μ g/ml y 20 μ l de bacterias calcio competentes en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se incubó en hielo por 1 hora con agitación suave, posteriormente se produjo un shock de calor a 37°C por un minuto, se adicionó 200 μ l de medio LB sin antibiótico y se incubó por 20 min. a 37°C para permitir la recuperación de los esferoplastos y la expresión del plásmido, se colocó la preparación en una caja de petri con antibiótico (100 μ g/ml de ampicilina). Se incubó toda la noche a 37°C.

*** VI Minipreparación de plásmidos :**

Para verificar la transformación de E. coli se realizó la minipreparación de acuerdo a la técnica descrita por Kado en 1983. Las células fueron crecidas en medio LB con antibiótico, la suspensión se centrifugó y el paquete celular fue lisado con SDS al 3% pH 12.3, la solución fue calentada a 50°C durante 20 min. y la extracción de DNA se realizó con fenol -cloroformo.

VI.- Producción de plásmidos a gran escala:

a) Crecimiento de bacterias.

Se transfirieron 20 ml de cultivo que creció durante toda la noche a un litro de medio LB con antibiótico y se incubaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una absorbancia de .4 a 600 nm, en este momento se le añadió 250 mg de cloranfenicol, se continuó con la incubación 14 horas más y de aquí en adelante los siguientes pasos se realizaron en frío.

b) Lisis celular.

Después de la incubación de las 14 horas el medio de cultivo fue centrifugado y el paquete celular fue lisado con una solución de .2 mg/ml de lisozima con agitación suave y hielo durante 5 min. posteriormente se le adicionó EDTA y tritón.

c) Aislamiento de plásmidos.

Las células lisadas fueron centrifugadas y el sobrenadante aforado a 30 ml con buffer TE. se le adicionó .95 gr./ml de CsCl₂ y un ml de bromuro de etidio, esta solución fue transferida a tubos de polipropileno y centrifugada a 230,000 xg por 12 horas a 25°C. el plásmido fue recuperado con la ayuda de luz ultravioleta de onda larga y depositado en tubos eppendorf para la eliminación de bromuro de etidio.

VII.- Electrophoresis:

La electrophoresis para el corrimiento del plásmido se realizó en geles de agarosa al 0.8 % en buffer de acetato a un voltaje constante de 70 volts, el corrimiento electroferetico del plasmido se observa en la fig. No. 10.

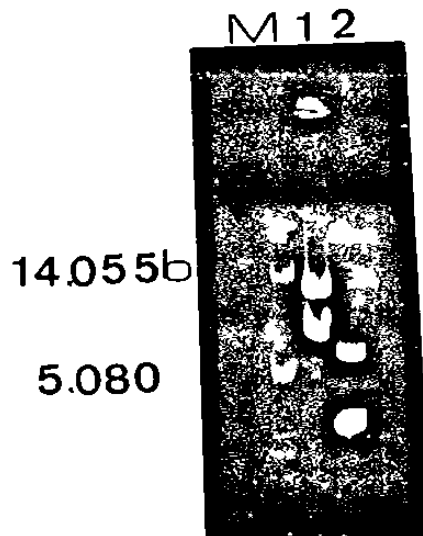
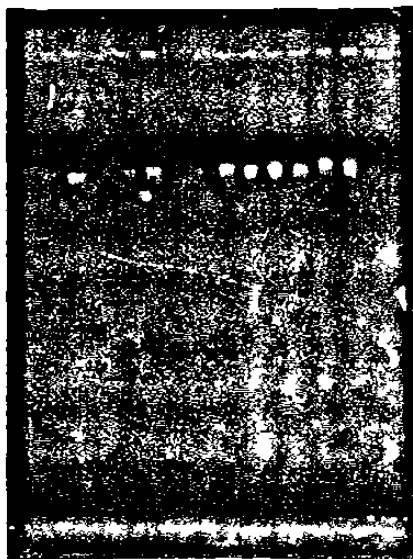


Fig. 10.- Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, donde se observa el plásmido pHT-3.9 (línea 1), marcador de peso molecular fago lambda digerida con pst-1. (M = el plásmido 5-6 el cual tiene un peso molecular de 4.787 b (línea 2).

VIII- Extracción de DNA:

Los linfocitos cultivados fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 500 μ l de buffer de lisis (10 mM de tris-HCl pH 8 10 mM de NaCl y 10 mM de EDTA), 10 μ l de proteinasa K, 50 μ l de SDS al 20 % y 50 μ l de EDTA 500 mM. las células fueron incubadas toda la noche a 55°C. al término de éste período se realizó la extracción de DNA con fenol saturado, se adiciono 500 μ l de fenol saturado y se agitó suavemente y se centrifugó 4 minutos en la microcentrifuga de eppendorff y la solución acuosa fue removida lentamente para no traernos la interface que contiene una gran cantidad de proteínas precipitadas y fue depositada en otro tubo nuevo, este procedimiento se repitió dos veces más, posteriormente a la fase acuosa se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se dejó incubar toda la noche a -20°C, posteriormente se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seca la pastilla se resuspendió con buffer TE. Para determinar la cantidad e integridad del DNA fue corrido en geles de agarosa al .8 % a 70 voltios constantes como se observa en la fig No. 11.

Figura No. 11.- Corrimiento electroforético de DNA de linfocitos obtenidos de la población de alto riesgo.



Los oligonucleótidos que utilizamos para éste trabajo fueron reportados por Matsumoto et al.(1990) para PCR en doble nido. La construcción de los oligos se realizó en el Centro de Investigación de Genética y Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos, México. La posición, el número de bases y el porcentaje de GC están representadas en la fig. No. 12.

Figura No. 12.- Características de los oligonucleótidos sintetizados para la amplificación del gen PX.

5- AGGGTTTGGACAGAGTCTT -3 19 pb

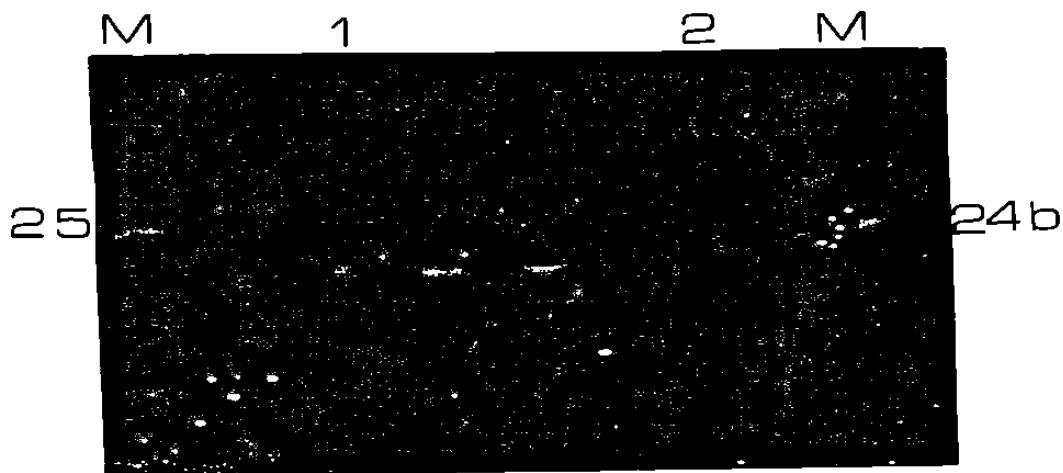
5'AAGGACCTTGAGGGTCTTAG -3 20 pb

N o. de pb	% de GC	posición
19	47	7212 -7330
20	50	7548 - 7567

IX.- Purificación de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos fueron corridos en un gel 20 % de poliacrilamida y 8 M de urea para visualizar la integridad de los oligonucleótidos las bandas de estos fueron teñidas con bromuro de etidio como se muestra en la fig. No. 13, las bandas específicas de los oligos fueron cortadas y se introdujeron en tubos eppendorff con 1 ml de agua tetradestilada estéril y se dejó incubar toda la noche, al día siguiente se retiró la acrilamida y los oligos fueron concentrados en un “savant” por evaporación del agua. Una pequeña muestra se corrió en un gel de poliacrilamida para observar su concentración.

Figura No. 13.- Gel de poliacrilamida al 20 % teñida con bromuro de etidio en el que se observa los oligonucleótidos de 19 b (1), 20 mer (2) y los marcadores de 24 y 25 mer (M)



X.-REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Se buscó amplificar la región PX del genoma de HTLV-1 en las muestras de pacientes positivos y débilmente positivos a las pruebas serológicas con los oligos descritos en la fig. No. 12. Todas las reacciones fueron llevadas a un volumen de 100 μ l conteniendo 50 pmol de cada primer, 50 mM de tris HCl pH 8.8, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 μ l de DNA template, 2 μ l de la enzima de *T. acuáticus* y 200 μ M de una mezcla de DNTPs, la reacción fue realizada por 30 ciclos a una temperatura de apareamiento de 60°C, una temperatura de polimerización de 72°C y una desnaturalización a una temperatura de 95°C por un min.

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Cuatro μ l de cada reacción completa de PCR fue mezclada con 4 μ l de buffer de de
corrimiento y corridas en un gel de poliacrilamida al 5 % en buffer de tris boratos_{OS}
pH 8. después de haber completado el corrimiento el gel fue teñido con bromuro de etidio y y
fotografiado bajo un transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS

POBLACION

Se probaron 2,095 muestras de sueros contra HTLV-I/II por la prueba de tamizaje de P.A. de acuerdo al riesgo de contraer la infección la población fue dividida en dos grupos: a) Población de alto riesgo (1,078) y b) Población de bajo riesgo (1,017) constituida principalmente por donadores de sangre.

El grupo de alto riesgo esta constituido por el 50.2 % (1,078) de la muestra total de los cuales 803 son originarios del noreste de la República Mexicana y 275 del estado de Guerrero (Tabla No.1, figura No. 14). El sexo y los diferentes subgrupos que constituyen esta población son descritos en las tablas 2 y 3.

Tabla 1. Origen de la población de alto riesgo a HTLV-I/II que fue utilizada para la búsqueda de anticuerpos contra el virus.

ZONA	ORIGEN	No. DE MTRAS	% DE MTRAS	% DE MTRAS TOTAL
	NUEVO LEON	396	45.95	34.23
	COAHUILA	217	27.02	20.12
NORESTE	TAMAULIPAS	98	12.20	9.09
	S.L.P	76	9.46	7.05
	CHIHUAHUA	43	5.25	3.98
	TOTAL	803	99.96	74.47
SURESTE	CHILPANCINGO	275		25.58
	TOTAL	1078		100.00

La población de alto riesgo esta constituida en un 74.47 % de individuos de la zona Noreste y el 25.58 % del estado de Guerrero

Tabla 2. Subgrupos de población de alto riesgo

POB. DE ALTO RIESGO	F	M	TOTAL
POLITRANSFUNDIDOS	201	18	388
LEUC./LINF.	183	152	335
CANCER	49	54	103
SIDA*	2	88	90
HOMOSEXUALES		87	87
SIFILICOS	61	14	75
TOTAL	496	582	1078

* Confirmado por W.B.

**ORIGEN DE LA POBLACION DE ALTO RIESGO
HTLV-III**

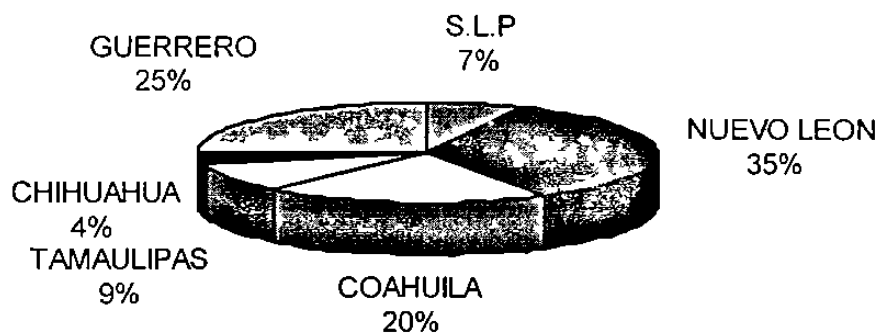


Fig. No.14 distribución esquemática de la población de alto riesgo

Algunos individuos con diferentes alteraciones patológicas que han recibido sangre o productos derivados de la sangre fueron agrupados como población politransfundida (tabla No. 2), porque el número total de individuos que recibieron transfusiones sanguíneas de toda la población fue de 457 lo que representa el 21%.

La población de riesgo fue dividida en 2 grupos de acuerdo a la edad Los niños (menores de 15 años) representan el 17.9% de la población total de alto riesgo y se encuentran clasificados principalmente en la población politransfundidos (116/59%) , y en menor proporción en cáncer (53/27.3%) y solamente una niña con SIDA (tabla No. 3).

Tabla 3 La población de alto riesgo se dividió en 2 grupos de acuerdo a la edad y el sexo

<i>EDAD</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>TOTAL</i>
<i>ADULTOS</i>	400	484	884
<i>Niños*</i>	96	92	194
<i>TOTAL</i>	496	582	1078

* Representan 17.99 % de la población total

Población de bajo riesgo (donadores de sangre).

De las 1,017 muestras de suero de donadores de sangre que fueron probados para determinar la prevalencia de anticuerpos contra HTLV-I/II. 882 (87%) fueron del sexo masculino y 135 (13%) del sexo femenino con un peso mínimo de 50 kg y cuyas edades fluctuaron entre los 18 a 40 años.

SEROLOGIA

PRUEBA DE AGLUTINACION PASIVA

A) Población de alto riesgo:

En esta población 23 muestras resultaron positivas, 17 de la zona noreste del país y 6 del estado de Guerrero, sin embargo al repetir las muestras del estado de Guerrero resultaron débilmente positivas así como 5 del noreste República y solo 1 positiva. la titulación de anticuerpos contra el virus fue de 2,048 unidades aglutinantes (UA) (figura No. 15 y 16).

Fig. No. 15.- Placa e PA con muestras de pacientes leucémicos y control positivo del kit (C+).

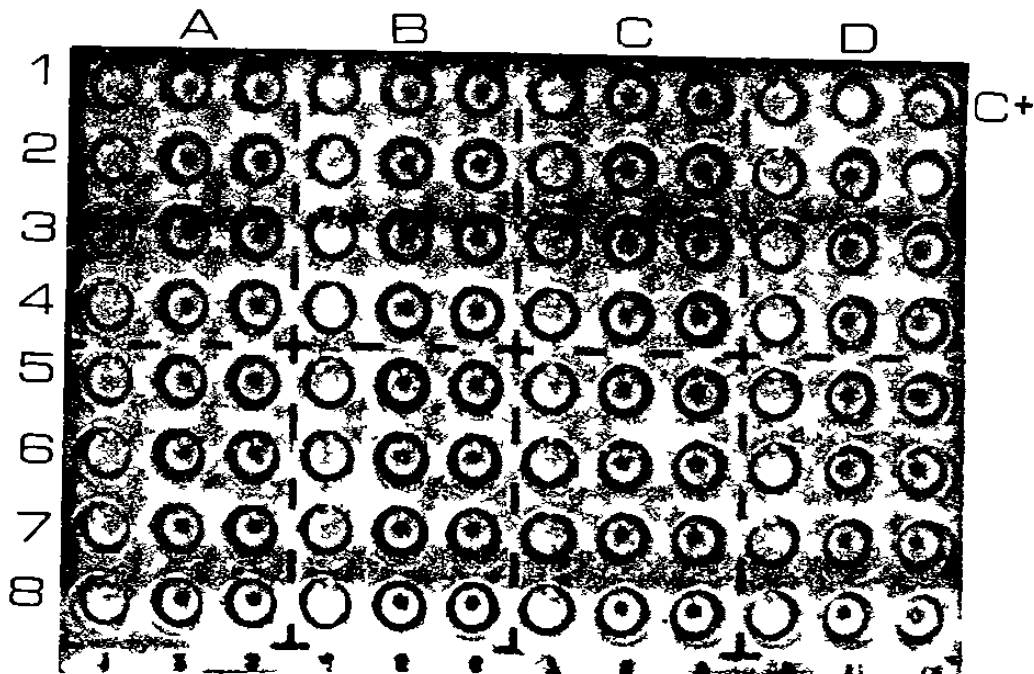
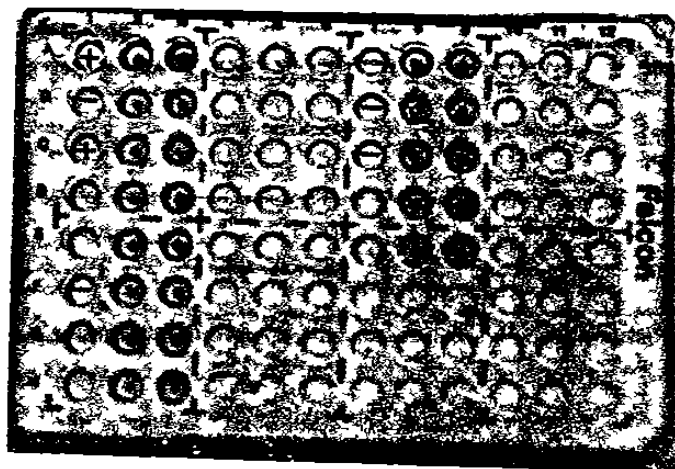


Fig. No. 16.- Pacientes de alto riesgo a la infección del virus sospechosas a PA.



b) Población de bajo riesgo (donadores de sangre):

De las 1,017 muestras probadas de la población de donadores 4 resultaron positivas y 20 débilmente positivas, estas últimas al repetirse nuevamente resultaron negativas. Las 4 muestras positivas fueron sometidas a una microtitulación de anticuerpos , de las cuales 3 tuvieron títulos superiores de 1:16 UA (Tabla No. 4). 3 de estas muestras fueron del sexo masculino y una del sexo femenino. lo cual indica

una prevalencia para esta prueba de 0.29 % en hombres y 0.098 % en mujeres (Fig. No. 17).

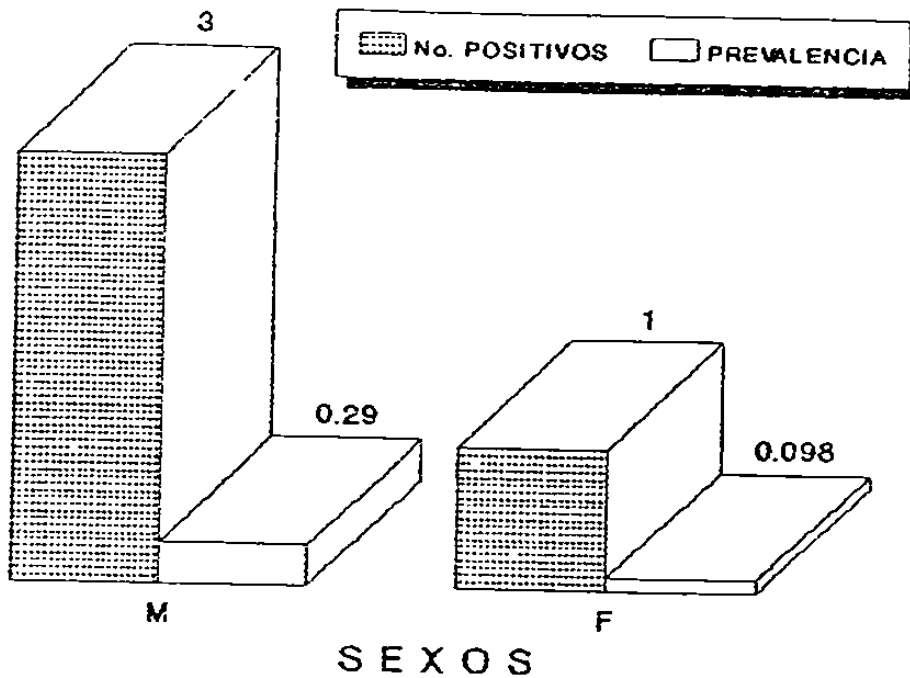
Tabla 4. Titulación de anticuerpos contra HTLV-I/II en muestras positivas por PA de donadores de sangre

N.o	DILUCION DEL SUERO					
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+
3	+	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-

Tabla 5. Prevalencia de anticuerpos contra HTLV-I/II por PA en la población de donadores de sangre.^o

SEXO	No. DE MUESTRAS	PA POSITIVOS	% DE PREVALENCIA
M	882	3	0.29
F	135	1	0.098

Fig.No.17 Prevalencia por PA a HTLV-I/II en hombres y mujeres donadores de sangre.



INMUNOADHERENCIA

Una vez estandarizada la prueba de inmunoadherencia (fig.18) fueron sometidas únicamente la población de alto riesgo encontrándose reactividad débilmente positiva para las 12 muestras (muestras positivas o débilmente positivas por PA) (fig. 19) y pacientes leucémicos (Fig. 20).

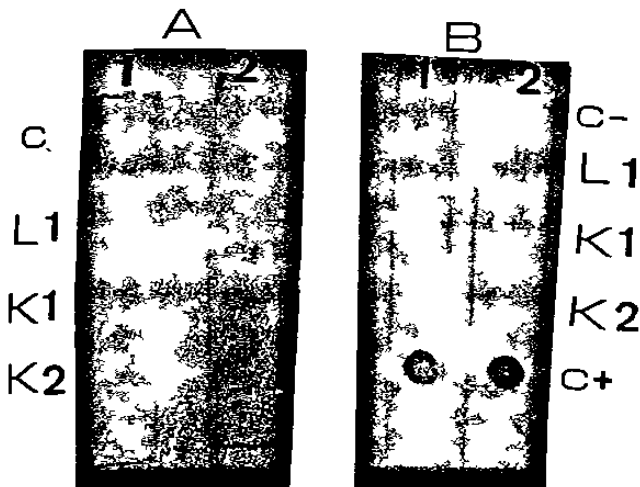


Fig. 18. Uso de EDTA para inhibir reacciones inespecíficas A) Se observa una reacción débilmente positiva en las muestras K1 y K2. B) se observa reactividad en el suero de conejo positivo.

A) Muestras tratadas con EDTA B) muestras sin tratamiento C- suero control negativo , C+ control positivo, K1 y K2 sueros positivo de Brasil y L1 paciente leucémico positivo a PA.

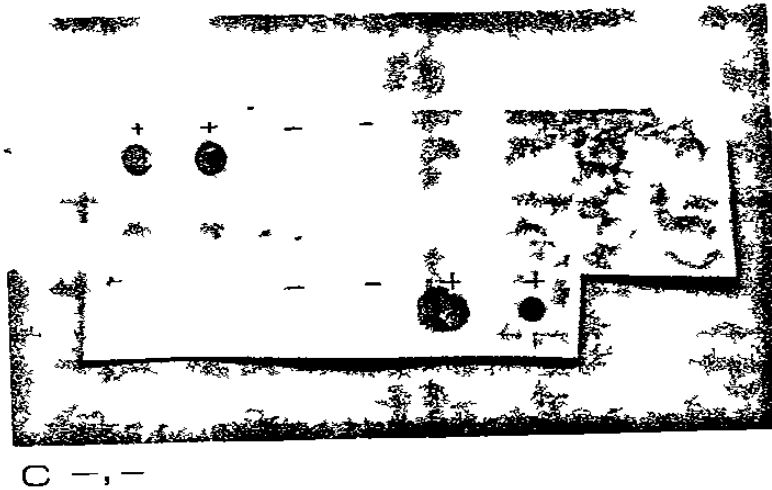
NOTA: Las muestras K1 y K2 fueron fuertemente positivas para las pruebas de PA y WB

Fig. No. 19.- Inmunoaderencia de muestras de pacientes leucémicos.



C Suero de conejo positivo al virus, C' suero de paciente de Brasil C- control negativo y del A 11 a' C2 son muestras positivas a PA.

Fig. No. 20.- Inmunoadherencia de muestras positivas y débilmente positivas a PA.



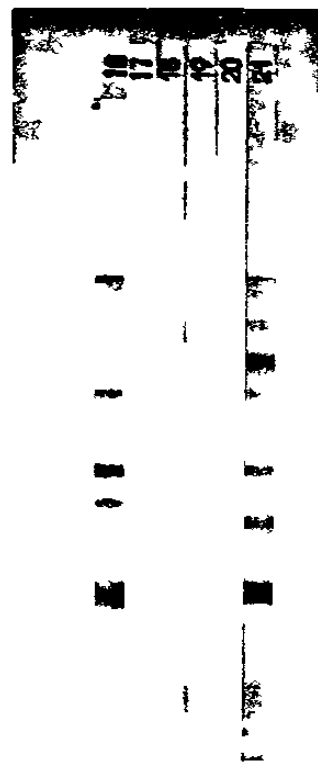
PRUEBA CONFIRMATORIA

Las 12 muestras que presentaron reactividad positiva a PA en la población de alto riesgo (11 débilmente positivas y 1 positiva por inmunoadherencia) fueron probadas por inmunoelectrotransferencia, ninguna presentó reactividad a las proteínas virales como se observa en las Fig. No. 21 y 22, mientras que en la población de donadores de sangre de las 4 muestras positivas a PA se observó reactividad en las muestras 2 y 3 para proteínas p24 y p19 respectivamente del gen gag del virus (Fig. No. 23). La tabla 6 resume los resultados de las diferentes pruebas serológicas.

Fig. 21.- Inmunoelectrotransferencia de los pacientes de alto riesgo positivos a PA del Noreste de la República. Carril 1. Control positivo del Kit de SERODIA, 2. Paciente fuertemente positivo. 3-5. Pacientes débilmente positivos. 6. Paciente positivo de Brasil.



Fig. 22.- Inmunoelectrotransferencia de los pacientes positivos del estado de Guerrero. Controles positivos* tiras 16 y 21. muestras de pacientes positivos a PA de la tira 17 a la 20.



*muestras de pacientes brasileños

Fig. 23.- Inmunoelectrotransferencia de los donadores de sangre positivos a PA (1-4) C+, control del kit comercial de inmunoelectrotransferencia.

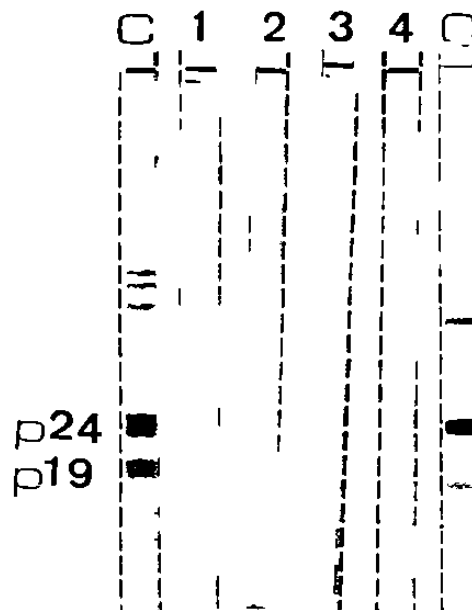


Tabla 6. Porcentaje de prevalencia de anticuerpos en la población de donadores de sangre y de alto riesgo al virus.

	DONADORES DE SANGRE	POBLACION DE ALTO RIESGO	POBLACION TOTAL
PRESED	% DE PREVALENCIA	% DE PREVALENCIA	% DE PREVALENCIA
PA	.393	0.092	0.230
WB	0.19	0.0	.092

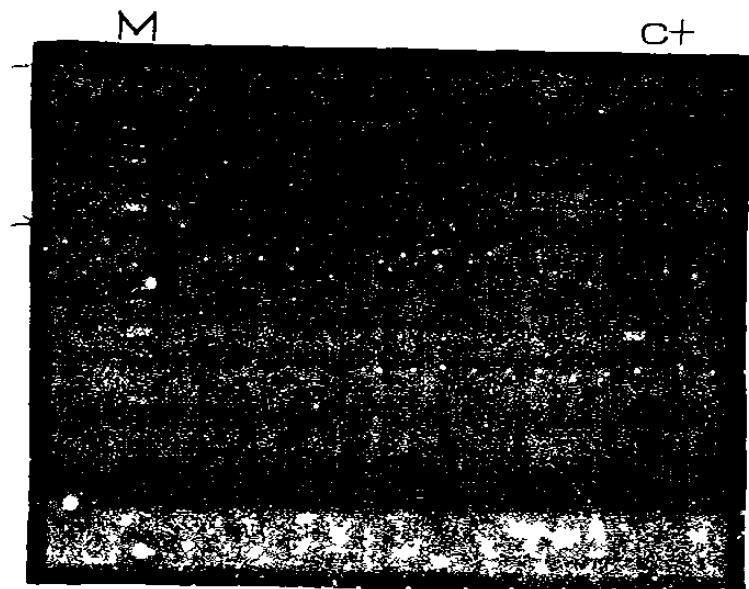
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Fueron probadas 18 muestras por la técnica de PCR las cuales incluían las 11 muestras débilmente positivas, 6 muestras negativas de pacientes leucémicos, y 1 con esclerosis múltiple, los controles positivos fueron DNA de un paciente brasileño y el plásmido pHT(3.9) que contiene las secuencias pX del virus. Las 18 muestras de la población de alto riesgo resultaron negativas por esta técnica. Fig. No. 24 y 25

Fig. No. 24.- PCR de los pacientes positivos a PA de la población de alto riesgo. C+ Control positivo (plásmido pHT 3.9)



Fig. 25. PCR de pacientes de alto riesgo negativo a AP. M marcador de peso molecular, del carril 12 al 18 pacientes de bajo riesgo negativos a PA y C control positivo pHT (M) 3.9



La tabla 7 resumen los resultados encontrados en este trabajo para las diferentes pruebas diagnósticas tanto en la población de alto riesgo como en la de donadores de sangre .

Tabla 7. Muestras probadas por PA, IDA, WB y PCR

MUESTRA	ORIGEN	PA	IDA	WB	PCR
1	N.L.	±	±	-	-
2	N.L.	±	±	-	-
3	GRO	±	±	-	-
4	N.L.	±	±	-	-
5	GRO	±	±	-	±
6	GRO	±	±	-	-
7	GRO	±	±	-	-
8	N.L.	±	±	-	-
9	N.L.	±	±	-	-
10	N.L.	±	±	-	-
11	N.L.	±	±	-	-
12	N.L.	+	ND	-	ND
13	N.L.	+	ND	-	ND
14	N.L.	+	ND	-	ND
15	N.L.	+	ND	p19,p24	ND
16	N.L.	+	ND	p19,p24	ND

La prueba de PA fue utilizado como prueba de tamizaje debido a que tiene una alta sensibilidad en el diagnóstico de HTLV-I/II, sin embargo presenta baja especificidad (80) en este trabajo se observaron 5 muestras positivas por PA (4 de donadores de sangre y una del grupo de politransfundido de la población de alto riesgo) y 11 débilmente positivas (todas de la población de riesgo). Las 16 muestras fueron sometidas a la prueba de WB y solamente en 2 muestras de la población de donadores se detectaron anticuerpos estructurales contra las proteínas *gag* p19 y la p24. Sin embargo la OPS considera indeterminados a pacientes seropositivos únicamente contra proteínas del gen *gag* o bien del gen *env*, para ser considerado como positivo debe de reaccionar al menos contra una proteína de *gag* y una de *env* (17). Se ha observado que los individuos indeterminados presentan anticuerpos principalmente para p19, no obstante recientemente se han detectado provirus por PCR en algunos de estos pacientes y se ha obtenido partículas virales en cultivo de linfocitos de algunos de estos pacientes (1). Algunos de los factores que complican la decisión para considerar a los indeterminados como positivos es la reactividad cruzada que existe entre la p19 de HTLV-I y la p22 del virus de la Varicela Zoster (19.65), existe la posibilidad de variación antigenica en las proteínas *env*, por lo tanto no hay reconocimiento de las proteínas del kit o bien otros tipos no I/II o subtipos diferentes pueden estar circulando. Además en mujeres embarazadas se ha encontrado anticuerpos dirigidos contra una proteína de 24 Kd que presenta reactividad cruzada contra la p24 de HTLV-I/II. Estas proteínas p24 presentan diferente punto isoeléctrico.(2)

Las 11 muestras débilmente positivas y 7 negativas por PA, (una de un paciente con esclerosis múltiple y 6 de pacientes leucémicos) fueron probados por PCR resultando negativos a la amplificación del virus. La amplificación se realizó de la secuencia pX, una región altamente conservada en este grupo viral. Los

LTR son otras zonas altamente conservadas las cuales pueden ser amplificadas para el diagnóstico viral

Aun en zonas de baja endemicidad como Estados Unidos en los grupos de alto riesgo la seroprevalencia es elevada principalmente en seropositivos para HIV (53). En nuestra población de estudio se consideraron los grupos de homosexuales y prostitutas como población de alto riesgo por transmisión sexual. El grupo de homosexuales se dividió en seropositivos y seronegativos para HIV debido a que se ha documentado la coinfección con estos dos retrovirus principalmente en homosexuales y en usuarios de drogas parentales (76).

Los resultados obtenidos para este grupo de trabajo (0/175), fueron similares a los reportados por Soriano et.al. (0/62) en Barcelona España, y a los reportados por Flores-Castañeda et.al. en esta misma área de estudio, sin embargo estos no concuerdan con los resultados obtenidos en Jamaica (5%), Trinidad (15 %), (áreas de alta seroprevalencia) y los Estados Unidos (0.08%) (área de baja prevalencia.) en cambio si existe una concordancia con respecto a la alta incidencia de HIV en estos países y en el noreste de la República Mexicana (41,49 71).

Khabbaz et.al. en Estados Unidos obtuvieron una seroprevalencia muy variable en el grupo de prostitutas, que iba de 0 % en el sur de Nevada hasta 25 % en Newark (37), en el sureste fue de 6.7 % , considerablemente más elevada que en la población de bajo riesgo 0.025 % . este grupo por la sobreactividad sexual y su relación con un gran número de individuos está muy expuesto a las enfermedades venéreas, todas las prostitutas probadas en este estudio eran pacientes con sífilis. Nosotros esperábamos encontrar seropositivas al virus en este grupo de riesgo, considerando la cercanía con el sureste de E.U. y la posibilidad de encontrarnos en una zona de prevalencia similar en población de bajo riesgo.

Otro grupo de alto riesgo probado fue el de pacientes con leucemias /linfomas, a pesar de que ninguno de los pacientes probados tenía leucemia o linfoma de células T de adulto (patología con asociación al virus confirmada), ha sido reportada la probable asociación del virus con otro tipo de leucemias de forma directa o indirecta, nuestros resultados fueron negativos al igual que los reportados por Soriano Et.al.(1990) en un número 5.35 veces mayor de muestras probadas (71).

Una de las poblaciones de más alto riesgo de infección son los individuos transfundidos con sangre, aumentando el riesgo con el número de transfusiones a los que son sometidos. La determinación de la seroprevalencia en donadores de sangre permite tener una idea clara de las posibilidades de infección por transfusión en una zona determinada. En nuestro estudio encontramos 4 donadores positivos por PA. 3 del sexo masculino y 1 del sexo femenino que correspondieron al 0.98 % y 0.29 % respectivamente, de estos, 2 dieron reactividad a las proteínas gag p19 y p24 para la prueba de WB. Las reacciones positivas a PA y negativas a WB probablemente son debidas a que los anticuerpos de los sueros problemas reconocen proteínas celulares contaminantes de los antígenos comerciales, como ya discutimos a reactividad cruzada con varicela zooster (61).

Desafortunadamente no se pudo realizar la prueba de PCR en los indeterminados, sin embargo siguiendo las especificaciones de la OPS no pueden ser considerados positivos, no obstante de que los títulos de anticuerpos encontrados por la prueba de PA fueron altos y de que existen evidencias de detección de proviru en pacientes indeterminados como ya se mencionó.

En Estados Unidos se ha encontrado una seroprevalencia de 0.043 % (3.3 veces más alta que para HIV) en 480,000 donadores de sangre (81), una población 471.9 más grande que la población probada en este trabajo. Los resultados de nuestro trabajo concuerdan con los encontrados por Rasulee en Cuba en donde se obtuvieron 7 muestras débilmente positivas a ELISA y 5 y 8 no determinado en 2 pruebas diferentes de WB (61,71).

Se ha observado hasta un 82 % de seroconversión en recipientes de sangre seropositiva a HTLV-I en áreas endémicas. En Estados Unidos se han realizado estudios con pacientes politransfundidos presentando una seroprevalencia de 3 %. En nuestra población se encontró un paciente politransfundido con altos títulos de anticuerpos por la prueba de PA sin embargo resultó negativo a la prueba confirmatoria de WB.

Los resultados de la población de alto riesgo de este trabajo concuerdan con los resultados de la población de alto riesgo de España y la población de donadores concuerdan con los resultados de Cuba, estos dos reportes son muy significativos para nuestro trabajo si tomamos en cuenta que la población Norte de la República Mexicana esta constituida principalmente por criollos descendientes de españoles. Cuba se encuentra en el área del Caribe donde se estima una seroprevalencia entre el 1 y el 8 % sin embargo en Cuba se han encontrado donadores de sangre indeterminados al virus pero ningun positivo resultados muy similares a los reportados en este trabajo (61,71).

Con los resultados obtenidos de la población de alto riesgo y donadores de sangre no podemos decir que no circula HTLV-I en nuestro medio. por las razones expuestas, en este trabajo y el numero de muestras con las que se trabajo .Es necesario ampliar el número y realizar PCR de regiones muy conservadas a muestras

de indeterminados. por lo que debemos de estar conscientes de el riesgo de infección de la población ya que de todas las vías ,de transmisión la transfusión de sangre es la más factible y desafortunadamente en los bancos de sangre de nuestro país no se realizan pruebas de tamizaje de rutina para la detección de este virus a candidatos donadores de sangre a diferencia de algunos países como Estados Unidos o Brasil.

En un intento para aumentar la sensibilidad y la especificidad por medio de una reacción amplificada así como de reducir los altos costos de las pruebas de tamizaje. estandarizamos una prueba de inmunoadherencia en la cual no se incremento la especificidad y sensibilidad es reducida drásticamente a tal grado que muestras positivas ya confirmadas con altos títulos de anticuerpo mostraron reacciones débilmente positivas. sin embargo se logro reducir los costos hasta en un 80 %. lo cual nos permite contar con una prueba de tamizaje a bajo costo. Probablemente la baja sensibilidad es debida a que el soporte que aglutina los antígenos vírales es demasiado grande y con los lavados se desprenden de los anticuerpos específicos que se encuentran en los sueros problemas positivos que fueron goteados en la nitrocelulosa. Sin embargo probablemente usando un soporte más pequeño y bajos títulos del segundo anticuerpo para evitar el bloqueo entre ellos se presenten mejores resultados.

CONCLUSIONES

- La circulación de HTLV-I en México es mas baja que en áreas de mediana endemicidad como los Estados Unidos.
- Los pacientes indeterminados deben de ser monitoreados durante cierto periodo mediante técnicas altamente sensibles y específicas.
- La prueba de inmunoadherencia amplificada puede ser utilizada como prueba de tamizaje por su bajo costo.
- Las muestras positivas por la prueba de PA requieren de pruebas confirmatorias para el diagnostico

REFERENCIAS

1. - Anderson, DW., J.S Epsytein, T.-H Lee, M.D. Lairmore, C. Saxinger, V. S .Kalyanaraman, D.Salmon, W.Par, B.J.Poiesz, L.t.Pierk, LH.Lee, R.Monagna, P.A.Roche, A.Williams & W.Blattner. 1989.Serologic confirmation of human T-lymphotopic virus type I infection in healthy blood and plasma donors.*Blood* 74:2581-2589
2. -Ando Y.; H.Hashimoto., K. Kakimoto.. T. Tanigawa., I.moriyama & M.Ichijo. 1990. p24 protein of human T-lymphotropic virus tipe T (HTLV-I) producing cell line (TCL-Kan) reacts with some normal pregnant women's sera.*Acta obst Gynaec Jpn.* 42:1251-1255.
3. - Agius G.; R. J. Biggar, S. S. Alexander., D. J. Waters., J. E. Drummond., E. L. Murphy., S. H. Weiss., P. H. Levine., & W. A. Blattner. 1988. Human T lymphotropic virus tipe I antibodies patterns: Evidence of difference by age and risk group. *J.Infect. diseases.*
4. - Ajdukiewicz A.; R. Yanagihara., R. M. Garruto., & D.C. Gajdusek. 1989. HTLV-I Myeloneuopathy in the solomon island. *New Engl.J.of Med.* 321: 615-616.
5. - Arango C.; M. concha., Z. Vladimir., R.Corrall., R. Biojo., I. Borrero., P. Rodger- Johnson., C. Mora., R. M. Garruto., C. J. Gibbs. & D. C. Gajdusek. 1988. Epidemiology of tropical spastic paraparesis in Colombia and associated HTLV-I infection. *Annals of Neurology.* 23: 161-165.

6. - Asher D. M.; J. Goudsmit., & K. L Pomeroy. 1988. Antibodies to HTLV-I in populations of the Southwestern Pacific. *J. Med. Virol.* 26:339-351.
7. - Asou N; T. Kumagai., S. Uekihara., M. Ishii., M. Sato., K. Sakai., H. Nishimura., K.Yamaguchi., & K. Takatsuki. 1986. HTLV-I seroprevalence in patients with malignancy. *Cancer.* 58: 903-907.
8. - Ballard W.D.; E bohnlein., J W. L., R Franza & Warner C.G. 1988 HTLV-I tax induce cellular proteins hat activate the Kb element in IL-2 receptor gene. *Sci.* 241:1652-1654.
9. - Bhagavanti S.; G.Ehrlich, R.W.Kula, S.Kwok, J.Sninsky, V.Udani, & B.J.Poiesz. 1988. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I DNA and antigen in spinal fluid and blood of patients with chronic progresive myelopathy. *New Engl.J.of Med.* 318:1141-1147.
- 10.- Blattner WA., V.S.Kalyanaraman., & M.Robert-Guroff. 1982. The human type C retrovirus, HTLV, in blaks fron the Caribbean region and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int.J.Cancer.*30:257-264.
- 11.- Bohnlein W.; M.Siekevitz., D.W.Ballard., J.W.Lowenthal., L.Rmisky., H.Bogerd., J.Hofman., Y.Wano., B.R.Franza & W.C.Green .1898. stimulation of the human immunodeficiency virus type I enhancer by the cell leukemia virus tye I tax gene product involves the action of inducible cellular proteins *J.Virology.* 63:1578-1586 .
- 12.- Brady.-J.; K.T.Jeang., J.Dovall & G.Khoury. 1987. Identification of the p40tax-responsive regulatory secuence within the human T cell leukemia virus type I long terminal repeat *J.Virolo.* 63; 2175-2118.

- 13.- Chen Y.A.; T.Hule., K.P.Samul., A.Okayama., N.Tacibana., I. Miyoshi., T.S. Papas & M. Essex. 1989. Antibody reactivity to diferents regions of human T cell leukemia virus type I gp61 in infected people. *J. Virol.* **63**: 4952-4957.
- 14.Clark J.W.; Gurgo C., G.F. Franchini., W.N. Gibbs., W. Lofters., C.Neuland., D. Mann., C. Saxinger., R.C. Gallo & W.A.Blattner.1988. Molecular Epidemiology of HTLV-I associated non-Hodkin's lynchomas in Jamaica. *Cancer.* **61**: 1477-1482.
- 15.- Cortez E.; R.Detels., D.Aboulaflia., Li Xl., T.Moudgil., M.Alam., C.Bonecker., A.Gonzaga., L.Dyafuso & M.tondo. 1989. HIV-1, HIV-2 and HTLV-1 infection in high-risk groups in brazil. *N.Engl.J.Med.* **320**: 992-995.
- 16.- Cross S.L.; M.B. Feinberg., J.B. Wolt., N.J. Hclbrook., F. Wong-Staal & W.J. Leonard. 1987. Regulation of the human interleukin-2 receptor chain promoter: activation of a nonfucional promoter by the transactivation gene of HTLV-I. *Cell.* **49**: 47-56.
- 17.- Federal Center of Aidas and Pan American Health Organization.1988. Report of the first international of director of national reference laboratoies (American region) Ottawa Ontario Canada Pan American Heath Organization, Washingto,D.C.
- 18.- Franca S.; J.A.Livramento., L.R.Machado., H.R.Gomes., L.S.Vianna., L.H.Castro., J.P.Nobrega., & L.A.Bachheschi. 1990. HTLV-1 antibodies in seru and cerebrospinal fuid in tropical spastic paraparesis in brazil. *Arg-Neuropsiquiatr.* **48**: 441-447.

- 19.- Folkers.E.; J.Vreeswijk., F.Wagenaar., J.G.Kapsenberg., H.J.Hulsebosch & A.P.Oranje. 1992. Immunoelectron microscopy for rapid diagnosis of varicella zoster virus in a complicated case of human T-cell lymphotropic virus type I infection. *J.Clin.Microbil.*30:2487-2491.
- 20.- Franchini G.; Wong-Staal F., & Robert C. Gallo. 1984. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) transcripts in fresh and cultured cells of patients with adult T-cell leukemia. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6207-6211.
- 21.- Fujisawa Jun-Ichi.; M. Toita & M. Yoshida. 1989. A Unique enhancer element for the transactivation p40tax of human T-cell leukemia virus type I that is distinct from cyclic AMP and 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element. *J. Virol.* 63: 3234-3239.
- 22.-Furuta Y.; S.Aizawa., Y.Suda., H.Ikawa., H.Kishimoto., Y.Asano., T.Tada., A.Hikikoshi., M.Yoshida & M.Seiki. 1989. Thymic atrophy characteristic in transgenic mice that harbor pX genes of human T-cell leukemia virus type I. *J. Virology.* 63:3185-3189.
- 23.- Garren J.E.; C.G. Begley, D.K. Warner., T.A. Waldmann & G. Jay. 1989. Transactivation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and the interleukin-2 receptor in transgenic mice carrying the human T- lymphotropic virus type I tax gene. *Mol. Cel. Biol.* 9: 4731-4737.
- 24.- Gout O.; M.Baulac., A. Gessain., F. Semah, F. Sal., J. Peries., CH. Cabrol.. C. Foucault-Fretz., D. Laplane., F. Sigaux & G. de The. 1990. Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac transplantation. *New Engl. J. of Med.* 322: 383-387.

- 25.- Gessain ,A.; A. Louie. A. Gout., R.C.Gallo, & G.Franchini. 1991. Human T-cell leukemia-limphoma virus type I (HTLV-I) expresion in fresh peripheral blood mononuclear cell from patients with tropical spstic paraparesis/HTLV-I -associated myelopathy. *J.Virol* 65: 1628-1633.
- 26.- Hino S.; K.Yamaguchi., & S.K.atamine. 1985. Mother to child trasmission of adult T cell leukemia virus type I *Jpn.J.Cancer Res.* 76:474-480.
- 27.- Hinrichs, S.H.; M. Nerenberg., R.K. Reynolds., G. Khoury & G. Jay. 1987. A transgenis mouse model for human neurofibromatosis. *Sci.* 237: 1340-1343.
- 28.- Hollsberg.P & D.A.Hafler. 1993. Pathogenesis of diseases induced by human lynchotropic virus type I infection.*New.Engl.J.Med* 328:1173-1182.
- 29.- Iwahara Y.; N.Takehara., R.Kataoka., T.Sawada., Y.Ohtsuki., H.Nakachi., T.Maehama., T.Okayama & I.Miyoshi.1990.Transmission of HTLV-I to rabbits via semen amd breast milk from seropositive healthy persons. *Int.J.Cancer* 45:980
- 30.-Ito.H.; R.Harada., Y.Uchida.,K.Odashiro.,K.Uozumi.,K.Yasumoto., T.Ohashi., W.Yamashita., & T.Uematsu. 1990. Lupus nephritis with adult T cel leukemia. *Nephon.* 55:235-238.
- 31.- Jacobson S., C. S. Raine., E. S. Mingioli & D. McFarlin. 1988. Isolation of an HTLV-I- Like retrovirus from patients with tropical spatic paraparesis. *Nature.* 331: 540-543.
- 32.- Jaffe J.E; W.A.Blattner, D.W.Blayney, P.A.Bunn, J.Cossman M.Robert-Guroff, & R.C.Gallo. 1984. The pathologic spectrum of adult T-cell leukemia/lymphoma in the United States. *Am.J.Surg.pathol.*4:263-275

- 33.- Jen Su Hi.: H. Chan., T. Kuo., T. Eimoto., Y. Maeda., M. Kikuchi., Y Kuan., L. Shih., M. Chen & M. Takeshita. 1985. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Taiwan. *Cancer*. **56**: 2117-2220.
- 34.- Kadison. P.; H,T, Poteat, K.M. Klein & D.V. Faller. 1990. Role of protein kinasa A in tax transactivation of the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J. Virol*. **64**: 2141-2148.
- 35.- Kajiyama W.; S. Kashiwagi., H. Nomura., H. Ikematsu., J. Hayashi & W. Ikematsu. 1986. Seroepidemiology study of antibodies to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japon. *Am. J. Epidemiol*. **123**: 41-47.
- 36.- Kataoka.R.; N.Tekehara, Y.Iwahara. T.Sawada, Y.Ohtsuk, Dawe, H.Hoshno, & .Mosh. 1990. Transmission of HTLV- by blood transfusion and its prevention by passive immunzation in rabbits. *Bood*.**76**:1657-1661.
- 37.- Khabbaz R. F., W. W. Darrow, T. M. Hartley, J. Witte, J. B. Cohen, J. French, P. S. Gill, J. Poiterat, R. K. Sikes, R. Reich. 1990. Seroprevalence and risk factors for HTLV-I/II infection among female prostitutes in the United States. *JAMA*. **263**: 60-64.
- 38.-Kobayashi,S.; T.Yoshida, Y.Hiroshige, T.Matsui, & M.Yamamoto.1988. Comparative studies of comercially available perticle agglutination assay and enzyme -linked immunosorbent assay for screening of human T-cell leukemia virus type I antibodies in blood donors. *J.Clin.Microbiology*. **26**:308-312.
- 39.- Lagrande , L.; B.Hanchard., V.Fletcher., B.Crasnsto, & W.Blattner. 1990. Infective dermatitis of Jamaica children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. **336**: 1345-1347.

- 40.- Leung K. & G.J.Nabel 1988. HTLV-I transactivation induce interleukina-2 Receptor expression through an NF-kB like factor. *Nature* 333:776-778.
- 41.- Manca N.; S.Graifenberghi & D.Colombrita 1990. Antibodies toHTLV-1-2, HIV-1 and HIV-2 in syphilitic patients. *Eur-J-Epidemiol.*6:201-206.
- 42.-Marriot S.J.; I.Boros., J.F.Duval., & J. N.Brady.1989. Indirect beding of human T-cell leukemiavirus type I tax, responsive element in the long terminal repeat viral. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4152-4169.
- 43.- Matsumoro.K.; M.Osame.,N.Eiraku., K.Machigashira., S.Izumo., K.Otsuka., S.Otani., M.Mori., S.Harda.,& K.Yanagi. 1990 HTLV-I associated myelopathy,tropical spastic paraperesis, and borrelia burdorferi. *Ann. Neurol.* 27:337.
- 44.-Matsumoto C.; S.Mitsunaga, T.Oguchi. Y.Mitomi, T.Shimada, A.Ichikawa, J.Watanave & K.Nishioka.1990. Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in preipheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method:Comparison with HTLV-I antibody tests. *J.Virol* .64:5290-5294.
- 45.-Matsuzaki H.; N.Asou., Y.Kawaguchi., H.Hata., T.Yoshinaga., E.Kinuwaki.,T.Ishii., K.Yamaguchi & K.takatsuki.1990.Human T-cell leukemia virus type I associated with small cell lung cancer. *Cancer.* 66.1763-1768.
- 46.- Maruyama M.; H. Shibuya., H. Harada., M. Hatakeyama., M. Seiki.. T. Fujita., J. Inoue., M. Yoshida., & Taniguchi. 1987.. Evidence for aberrant activation of the interlukin-2 autocrine loop by HTLV- encoded p40xy T3/Ti complex triggering. *Cell.* 48: 343-250.

- 47.- Minamoto Y. G.; J. W. M. Gold., D. A. Scheinberg., W. D. Hardy., N. Chein., E. Zuckerman., L. Reich., K. Dietz., T. Gee., J. Hoffer., K. Mayer., J. Gabrilove., B. Clarkson & D. Armstrong. 1988. Infection with human T-cell leukemia virus type I in patient leukemia. *New. Engl. J. Med.* 328: 219-222.
- 48.- Miyatake Sh.; M. Seiki., M. Yoshida & K. Arai. 1988. T- cell activation signals and human T-cell leukemia virus type I-encoded p40x protein activate the mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene through a common DNA element. *Mol. Cell. Biol.* 8: 5581-5587.
- 49.- Murphy. E.L.; W. N. Gibbs., J.P. Figueroa., B. Bain., LaGrande., B. Cranston., & W.A. Blattner.1988. Human immunodeficiency virus and human T-lymphotropic virustype infection among homosexual men in Kingston, Jamaica. *J. of Acq. Imm. Defic. Synd.* 1: 143-149.
- 50.- Nagashima K., M. Yoshida &M. Seiki. 1986. A single species of pX mRNA of human T-cell leukemia virus type I encodes trans-activator p40x and two other phosphoprotein. *J. Virol.* 60: 394-399.
- 51.-Nagata K.: K. Ohtani., M. Nakamura., & K. Sugamura. 1989. Activation of endogenous c-fos proto-oncogen expression by human T-cell leukemia virus type I encoded p40tax protein in the human T-cell line. Jurkat *J. Virol.* 63: 3220-3226.
- 52.-Nakauchi C. M.; A. C. Linhares, K. Maruyama, L. I. Kanzaki, J. E. Macedo. V. N. Acevedo & J. S. R. Casseb. 1990. Prevalence of Human T Cell Leukemia Virus-I (HTLV-I) Antibody Among Populations Living In The Amazon Region of Brazil (preliminary report). 85:29-33.

- 53.- Nathaniel R.L.; A.P .Katheleen & D.R.Littman .1991.Pseudotyping with human t-cel leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency vieus host range.*J.Virol.*65:162-169.
- 54.- Nishimura M.; A.Adechi., M.Maeda., I.Aliguchi., A.Ishimoto & J.Kimura. 1990. Human T lymphotropic virus type I may not be associated wit multiple sclerosis in Japan. *J.Immunol.* 144:1684-1688.
- 55.- Osame M. 1987."Chronic progressive myelophaty associated with elevated antibodies to human T- lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemialikecells. *Ann. Neur.* 21: 117-122.
- 56.Outtara S.A., M. Gody & G. de-Thé. 1989. Prevalence of HTLV-I Compared to HIV-1 and HIV-2 Antibodies in Different Groups in the Ivory Coast (West Africa). *J. of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 2: 481-485.
- 57.- Patey O.; R.Bochali., J.Brevil.,L.Chapois.,A. Courillon-Mallet & C.Lafaix. 1990. Arthritis associated with strongyloides stercolaris. *Scand-J-Infect-Dis.* 22: 2336.
- 58.- Poiesz B. J.;ction and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patient with cutaneou T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 7415-7419.
- 59.- Piccardo P.; M. Ceroni., P. Rodger-Johnson., C. Mora., D. M. Asher., G. Char., C. J. Gibbs & D. C. Gajdusek. 1988. Patological end immunological observation on tropical spastica paraparesis in patients from Jamaica. *Ann. Neurol.* (Suppl.). 156-160.

- 53.- Nathaniel R.L.; A.P .Katheleen & D.R.Littman .1991.Pseudotyping with human t-cel leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency vious host range.*J.Virol.*65:162-169.
- 54.- Nishimura M.; A.Adechi., M.Maeda., I.Aliguchi., A.Ishimoto & J.Kimura. 1990. Human T lymphotropic virus type I may not be associated wit multiple sclerosis in Japan.*J.Immunol.* 144:1684-1688.
- 55.- Osame M. 1987."Chronic progressive myelophaty associated with elevated antibodies to human T- lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemialikecells. *Ann. Neur.* 21: 117-122.
- 56.Outtara S.A., M. Gody & G. de-Thé. 1989. Prevalence of HTLV-I Compared to HIV-1 and HIV-2 Antibodies in Different Groups in the Ivory Coast (West Africa). *J. of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 2: 481-485.
- 57.- Patey O.; R.Bochali., J.Brevil.,L.Chapois.,A. Courillon-Mallet & C.Lafaix. 1990. Arthritis associated with strongyloides stercolaris. *Scand-J- Infect-Dis.* 22: 2336.
- 58.- Poiesz B. J.;ction and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patient with cutaneou T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 7415-7419.
- 59.- Piccardo P.; M. Ceroni., P. Rodger-Johnson., C. Mora., D. M. Asher., G. Char.. C. J. Gibbs & D. C. Gajdusek. 1988. Patological end immunological observation on tropical spastica paraparesis in patients from Jamaica. *Ann. Neurol.* (Suppl.). 156-160.

- 60.- Puzzatti R.; J. Vogel & G. Jay. 1990. The human T- lymphotropic virus type I tax cooperates with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 413-417.
61. Rasulee.A., Riverend.E. J. Shih. N. Senjuta O. Pavilish. A. Syrtsev. N. Klepikov H. Lee & V. Gurt-Sevitch. 1993. HTLV-I seroprevalence in blood donors in Cuba. *Int. J. Cancer.* **54**: 885-886
- 62.- Robert- Guroff M.; S. H. Weiss., J. A. Giron., A. M. Jennings., H. M. Ginzburg., I. B. Margolis., W. A. Blattner & R. C. Gallo. 1986. Prevalence of antibodies to HTLV-I, II, and III in intravenous drug abusers from an AIDS endemic region. *JAMA.* **225**: 23-27.
- 63.- Rodger-Johnson P.; O. St. C. Morgan., C. Mora., P. Sarin., M. Ceroni., P. Piccardo., R. M. Garruto., C. J. Gibbs & D. C. Gajdusek. 1988. The role of HTLV-I in tropical spastic paraparesis in Jamaica. *Ann. Neurol.* **23**: (suppl) 121-126.
- 64.- Roman C. G. 1988. Neuroepidemiology of tropical spastic paraparesis. *Ann. Neurol.* **23** (suppl.) 113-120. Satow Y., M. Hashido., K. Ishikawa., H. Honda., M. Mizuno., T. Kawana and M. Hayami. 1991. Detection of HTLV-I antigen in peripheral and cord blood lymphocytes from carrier mother. *Lancet.* **388**: 915-916.
- 65.- Sato. A.; Y. Isaka., F. Morita., A. Ishii., Y. Goto., J. Imai., H. Igarashi., O. Yoshie & Y. Hinuma. 1992. Human sera from varicella zoster virus (VZV) infection cross-react with human T cell leukemia virus type I (HTLV-I): common epitopes in VZV gene 22 protein and HTLV-I p 19 gag protein. *J. gen. virol.* **73**: 2969-2973

- 66.- Satow Y.; M.Hashido. K.Ishikawa, H.Honda. M.Mizudo. T.Kawana, & M.Hayami.1991. Detection of HTLV-I antigen in peripheral and cord blood lymphocytes from carrier mothers. *Lancet* .338:915-916.
- 67.- Seiki M.. H. Seisuhe.; Y. Hirayama., & M. Yoshida. 1983. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3618-3622.
- 68.- Shimotohno K.; M. Takano., T. Teruchi & M. Miwa. 1986. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeat for trans-acting activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8112-8116.
- 69.- Siomi H.; H. Shida., S. Nam., T. Nosaka., M. Maki & M. Hatanaka. 1988. Sequence requirements for nuclear localization of human T-cell leukemia virus type pX proteins, which regulate viral RNA processing. *Cell* 55: 197-209.
- 70.- Sodroski G.J.; W. C. Gon., C. A. Rosen., S. Z. Salahuddin., A. Aldovini., G. Franchini., F. Wong-Stall., R. C. Gallo ., K. Sugamura Y. Hinuma & W. A. Haseltine. 1985. Trans-activation of the human T-cell leukemia virus long repeat correlates with expression of the x-lor protein. *J. Virol.* 55: 831-835.
- 71.Soriano.V.. J.Tor. A.Rivera.,b:Clotet. R.Muga M.pu plana. E.abella.j.Fernando.A.Flores & M.Foz .1990. Evidence of HTLV-I infection in different groups at risk in Barcelona. *Med.Clin.Barc.*94:5-8
- 72.- Taguchi K.; K. Niiya.. I. Kubonishi., S. Yano., S. Yoshimoto., M. Fujishita., T. Kitawaga.. M. Mitani & I. Miyoshi

- 73.- Tan, T.H.; M. Horikoshi & R. G. Roeder. 1989. Purification and characterization of multiple nuclear factor that bind to the Tax-inducible enhancer within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1733-1745.
- 74.- Tan, T. H.; Ran Jia & R. G. Roeder. 1989. Utilization of signal transduction pathway by the human T-cell leukemia virus type I transcriptional activator tax. *J. Virol.* 63: 3761-3768.
- 75.- Temple, J. J.; M. G. Brammer, A. Andes, S. Covington & S. Rangan. 1986. Adult T-cell leukemia-lymphoma. *Cancer* .68:694-698.
- 76.- Titti.F.; G.Rezza, P.Verani, S.Butto, L.Sernicola, M.Rapicetta, B.Sarrecchia, C.Oliva & G.B.Rossi. 1988. HIV, HTLV-I, and HBV Infections in a cohort of Italian intravenous drug abusers: analysis of risk factors. *J.Acq Imm.Desf. Syndromess* 4:405-411.
- 77.- Toyoshima,H.; M. Itoh., J. Inoue., M. Seiki., F. Takaku & M. Yoshida. 1990. Secondary structuraof the human T-cell leukemia virus type I rex-responsive element is essential for rex regulation of RNA processing and transport of unspliced RNAs . *J. Virol.* 64: 2825-2832.
- 78.-Turbitt, M. L. & R. M. Mackie.1985. p19 antigen in skin and lymphonodes of patient with advanced mycosis fungoides. *Lancet* 945-946.
- 79.-Wong-Stall & R. G. Gallo. 1985. Human T-lymphotropic retrovirus. *Nature.* 317:395-403.
- 80.White P. Comparison of assays for antibody to HTLV-I . 1988 *J.Clin Pathology* 4: 700-702.

- 81.-Williams, A. E.: C. T. Fang, D. J. Slamon, B. J. Poiesz, S. G. Sandler, W. F. Darr II, G. Shulman, E. I. McGowan, D. K. Douglas, R. J. Bowman, F. Peetoom, S. H. Kleinman, B. Lenex & R. Y. Dodd. 1988. Seroprevalence and epidemiological correlates of HTLV-I infection in U.S. blood donors. *Science* 24:643-646.
- 82.- Zaninovic, V.; C. Arango, R. Biojo, C. Mora, P. Rodgers-Johnson, M. Concha. R. Corral, P. Barreto, I. Borrero, R. M. Garruto, C. J. Gibbs Jr., & D. C. Gajdusek. 1988. Tropical spastic paraparesis in Colombia. *Ann Neurol*. 23:S127-S132.

