

Aplicación del ensayo de movilidad del heterodúplex en los estudios de epidemiología molecular del VIH-1 en Cuba

✉ Madeline Blanco de Armas, Felipe Rolo Gómez, Nadia Martínez Marrero, Alely Gessa Abreu, Héctor Díaz Torres, Ana L Lubián Caballero

Laboratorio Nacional de Referencia de SIDA. Carretera de Tapaste y Ocho vías. San José de las Lajas. Provincia Habana. AP 23031. Marianao. Telf.: 57 4009; Fax: (53-7) 57 4152; E-mail: cicdc@infomed.sld.cu

RESUMEN

Para realizar la caracterización genética de cepas de VIH-1 circulantes en Cuba se empleó, en los últimos años, la técnica de secuenciación nucleotídica del ADN. Es un método complejo que consume tiempo y tiene un alto costo. En la actualidad existen otras técnicas como el ensayo de movilidad del heterodúplex, que se pudiera emplear con los mismos propósitos que la anterior, con la ventaja de ser más sencilla y más rápida. En este trabajo se aplica este ensayo para determinar la prevalencia de los subtipos del VIH-1 en una población seleccionada, y describir su distribución de acuerdo con el posible lugar de contagio y la orientación sexual de las personas infectadas. Finalmente, se propone detectar la introducción de nuevos subtipos no informados hasta el momento en Cuba. La importancia esencial de investigar sobre la epidemiología del VIH-1, con el empleo del ensayo de movilidad del heterodúplex, radica en que permite mantener una vigilancia epidemiológica a nivel molecular sobre la circulación del virus. Se investigó una muestra formada por 70 personas con diagnóstico positivo de anticuerpos contra VIH-1, confirmado por Western blot durante 1997, procedentes de las 11 provincias con mayor prevalencia de la infección por este virus en el país. Los resultados demostraron que los subtipos existentes son A, B y C con predominio de B. Iguales resultados se encontraron cuando se analizó la muestra según la orientación sexual. Se concluyó que el ensayo de movilidad del heterodúplex es un método válido para determinar el genotipo de cepas del VIH-1 de forma rápida y con resultados que coinciden con lo informado hasta el momento en trabajos anteriores.

Palabras claves: diversidad genética, envoltura, epidemiología molecular, genotipaje, HMA, pesquisa genética, RCP, región V3, relación genética, subtipo, VIH-1

Biotecnología Aplicada 2001;18:149-153

ABSTRACT

Application of Heteroduplex Mobility Assay in Molecular Epidemiology Study of HIV-1 in Cuba. During the past few years, DNA sequencing has been used to genetically characterize HIV-1 strains circulating in Cuba. It is a complex method that consumes time and has a high cost. There are other techniques such as heteroduplex mobility assay which could be used to this end, with the advantage of being simpler and faster. In this work, the heteroduplex mobility assay is performed to determine the prevalence of HIV-1 subtypes in a selected population and to describe their distribution according to the possible place of transmission and the sexual orientation of the infected people. Eventually it is proposed to detect the introduction of new subtypes not informed in Cuba so far. The relevance of investigating HIV-1 epidemiology by using heteroduplex mobility assay lies in the possibility of maintaining an epidemiological surveillance at molecular level on virus circulation. A sample of 70 patients positive to HIV-1 antibodies from the 11 provinces with the highest prevalence of HIV-1 infection in the country was studied, which were confirmed by Western blot in 1997. The results demonstrated that the existing subtypes are A, B and C being B the predominant one. Similar results were obtained when the sample was analyzed according to sexual orientation. It was concluded that heteroduplex mobility assay is a valid method for rapidly genotyping HIV-1 strains in consistence with the results previously informed

Keywords: envelope, genetic diversity, genetic relationships, genetic screening, genotyping, HIV-1, HMA, molecular epidemiology, PCR, subtype, V₃ region

Introducción

Uno de los problemas fundamentales de las investigaciones epidemiológicas sobre el VIH es el conocimiento de su distribución en las diferentes zonas geográficas y la posible asociación de cepas con diversos grupos poblacionales. Para estudiar y profundizar en estos problemas, la Epidemiología se apoya en el análisis molecular de la variabilidad genética del VIH, que es muy extensa y mayor en el gen de la proteína de la envoltura. Los estudios moleculares de esta región han permitido clasificar y agrupar al VIH en múltiples subtipos genéticos que van desde el A hasta el H y el O, localizados en diferentes regiones del mundo [1-3].

En 1995, Rolo y colaboradores realizaron una caracterización genética y biológica de cepas de VIH-1

circulantes en Cuba. Se utilizó la técnica de secuenciación nucleotídica del ADN y los resultados permitieron determinar que en un grupo de 60 pacientes existió un predominio de cepas pertenecientes al subtipo B: 42 de ellos clasificados en este subtipo, 4 fueron caracterizados como C, 6 como A y de los 8 restantes no se pudo determinar el subtipo [4, 5].

La complejidad y el costo de esta técnica propician la aplicación de otros métodos de tamizaje genético más simples, entre ellos el ensayo de movilidad del heterodúplex (HMA, del inglés *heteroduplex mobility assay*) [3, 6, 7].

Existen otras técnicas de tamizaje genético a nivel molecular, como el polimorfismo conformacional de

1. López-Galíndez C. Epidemiología molecular del VIH-1. SEISIDA 1997;8(4): 99-100.

2. Nájera I, Nájera R, de Andrés L, Medrano L, Pérez LA, Contreras G. Epidemiología molecular del VIH. SEISIDA 1995;6(1):1-6.

3. Osmanov S, Belsev L, Heyward W, Esparza J, Bradac J, Galvao-Castro B, et al. HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of representative viral strains. AIDS Res Hum Retrov 1994; 10:1327-43.

simple cadena (SSCP, del inglés *single-strand conformational polymorphism*), que requiere marcaje radiactivo al igual que la técnica de digestión escisión de nucleótidos desapareados con Rnasa (Re mismatch) o el estudio del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), en la cual, debido a la pérdida de los sitios de restricción, no se puede determinar el subtipo de muchas cepas no pueden ser tipadas [7-12]. El HMA ofrece algunas ventajas sobre todas estas técnicas fundamentalmente en el sentido de que es más sencilla y los resultados se obtienen con mayor rapidez.

Para el estudio de cepas de VIH-1 por HMA, se amplifican fragmentos del gen de la proteína de la envoltura a partir del ADN proviral de una muestra desconocida y se mezclan con fragmentos análogos derivados del ADN (clonado en plásmidos) de cepas de referencia reconocidas como patrones para cada uno de los subtipos que circulan en el universo para el gen de envoltura del VIH-1. El reconocimiento de ambos fragmentos de ADN genera la formación de un heterodúplex. Estos heterodúplex se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y se calcula su movilidad en relación con las bandas de homodúplex. La mayor o menor movilidad relativa se corresponde con una mayor o menor homología del heterodúplex con el patrón correspondiente respectivamente.

La investigación sobre la situación actual en Cuba relacionada con la infección por VIH-1, con el empleo del HMA, permitiría mantener una vigilancia epidemiológica a nivel molecular sobre la circulación del VIH, establecer la posible asociación de los subtipos con los diferentes grupos de riesgo e incrementar el conocimiento sobre el origen de la epidemia, entre otros aspectos. La profundización, además, en el conocimiento básico de la epidemiología molecular del VIH-1 es imprescindible para el desarrollo de una vacuna eficaz, puesto que se podría contar con la representatividad antigénica de los aislamientos locales [13-17].

Los propósitos de este trabajo son determinar la prevalencia de los subtipos virales en una población seleccionada y describir su distribución de acuerdo al posible lugar de contagio y a la orientación sexual de las personas infectadas. Finalmente, se propone también detectar la introducción de nuevos subtipos no informados hasta el momento en Cuba.

Materiales y Métodos

Muestra de población

En el estudio se incluyeron 70 personas con diagnóstico positivo de anticuerpos contra VIH-1 (seroconversión en los últimos seis meses) confirmada por Western blot durante 1997, procedentes de las 11 provincias con mayor prevalencia de la infección por este virus en Cuba. Las muestras fueron seleccionadas proporcionalmente de acuerdo a la incidencia en cada una de las provincias durante el año anterior.

Toma de las muestras

Se extrajeron 10 mL de sangre periférica por punción venosa y se colectó en tubos estériles con anticoagulante (EDTA 0,2 M pH 7,2, 500 µL).

Extracción de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

La extracción de CMSP se realizó en gradiente de Ficoll Hypaque (Amersham Pharmacia-Biotech, Suecia) [18, 19]. El gradiente con la muestra de sangre se sometió a centrifugación (400 xg durante 30 min a 20 °C) y se separó el anillo de células mononucleares con una pipeta Pasteur. Las células se lavaron con PBS (NaCl 0,14 M; KCl 0,003 M; Na₂HPO₄ 0,008 M; KH₂PO₄ 0,0015 M; pH 7,4) y se centrifugaron (400 xg durante 10 min a 20 °C) para obtener el sedimento celular.

Extracción del ADN

A partir de las células mononucleares se obtuvo el ADN cromosomal con la adición de 1 mL de solución NTE (Tris-HCl 10 µM pH 8,3; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM pH 8), 100 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% y 10 mL de proteinasa K 100 µg/mL. Se incubó durante toda la noche a 37 °C. Se realizó una extracción con fenol-cloroforno-alcohol isoamílico para desproteinizar y se precipitó el ADN con tres volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó a 13 000 xg durante 5 min, el precipitado se secó al vacío y se disolvió posteriormente en 100 mL de agua destilada libre de nucleasas [20]. La concentración del ADN y su pureza se evaluaron mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm y las muestras se ajustaron para lograr una concentración aproximada de 2 µg/mL. La integridad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa a 1%.

Reacción en cadena de la polimerasa (RCP) anidada

El provirus del VIH-1 obtenido se amplificó a partir de 2 µg de ADN genómico. La primera RCP se realizó en un volumen final de 50 µL con el juego de cebadores ED3/14 (Tabla 1), el cual reconoce un fragmento de 2,0 kb aproximadamente que abarca desde el primer exon del gen *rev* hasta la secuencia que codifica la proteína de transmembrana gp41, que equivale a la región que codifica las proteínas de la envoltura. El tampón de RCP contiene KCl 50 mM; tris 10 mM pH 8,3; MgCl 1,5-1,75; DMSO 1%; glicerol 1%; 10 pmol de cada cebador; 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 2,5 unidades de Taq polimerasa (Promega Corp., E.U.A.) [13, 15, 16].

Las condiciones de reacción fueron programadas en un termociclador automático (PTC-100 MJ Research Inc., E.U.A.) de la manera siguiente: 3 ciclos de 2 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C, seguido de 32 ciclos de 15 s a 92 °C, 45 s a 55 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C.

La segunda ronda de RCP se realizó de igual manera, sólo que el ADN blanco en este caso fueron 2 µL del producto amplificado en la primera ronda y los cebadores utilizados fueron ED5/12 (Tabla 1), que hibridan en un fragmento interno de 1,25 kb aproxima-

Tabla 1. Oligonucleótidos cebadores utilizados en la RCP anidada

Primera ronda
ED3 5'TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG (5956-5985)
ED14 5'TCTTGCCTGGAGCTGTTTGATGCCCCAGAC (7960-7931)
Segunda ronda
ED5 5'ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG (6556-6581)
ED12 5'AGTGCTCTCTGCTGCCAAGAACCCTAAG (7822-7792)

4. Rolo FM, Miranda L, Wainberg M, Gu Z, Labaina L, Noa E, et al. Envelope V3 region sequences of Cuban HIV-1 isolates. *J Acq Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 1995;9:123-5.

5. Blanco M, Rolo FM, Díaz H, Cassol S, Sheik T, Gómez C. Transmission of HIV clade A and C in Cuba. *J Virol* (En prensa).

6. WHO network for HIV isolation and characterization. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic, screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Human Retrov* 1994;10(11):1325-1341.

7. López-Galíndez C, Rojas JM, Nájera R. Characterization of genetic variations and 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistance mutations of human immunodeficiency virus by the RNase A mismatch cleavage method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4280-4.

8. Esparza J. Development of WHO-sponsored sites for HIV vaccine evaluation. *AIDS Res Human Retrovir* 1993;9 (suppl.1):S133-4.

9. Osmanov S, Belsey L, Heyward W. HIV-1 variation in WHO-sponsored vaccine evaluations sites: genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. *AIDS Res Human Retrovir* 1994;10: 1327-44.

10. Orita M, Suzuki T, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989;5:874-9.

11. Simmonds P, Balfe P, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJL. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990;64: 5840-50.

12. Workshop report from the European Commission and the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. *Special Report. AIDS*. 1997, 11: UNAIDS17-UNAIDS36.

13. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Mullins JI, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 "env" genes. *Science* 1993;262: 1257-61.

14. Delwart EL, Sheppard HW, Walker BD, Goudsmit J, Mullins JI. HIV-1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays. *J Virol* 1994; 68:6627-83.

15. Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JI. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using heteroduplex mobility assays. *Manual supplement. In: PCR methods and applications. Cold Spring Harbor Laboratory Press;1995;4:5 202-S 216.*

16. Delwart EL, Shpaer EG, Mullins JI. Heteroduplex mobility assays for phylogenetic analysis. In: Innis, et al., editors. *PCR strategies*. San Diego: Academic Press; 1995.

damente que codifica la región V1-V5 de la gp120. Además, en esta ronda se amplificaron todos los subtipos de referencia que son fragmentos correspondientes al gen de envoltura de cepas aisladas en diferentes regiones geográficas y que fueron clonados en un vector plasmídico. Estos subtipos de referencia se utilizan como patrones para determinar las variaciones genéticas en la muestra desconocida (Tabla 2). Para su amplificación se tomaron 10 ng de ADN plasmídico.

Antes de ser sometidos a la formación del heterodúplex, estos productos de la RCP se observaron en un gel de agarosa 1% (100 V, 45 min, tampón TBE 1X (Tris 88 M, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM) para determinar algunas características físico-químicas de los mismos a partir de un patrón de peso molecular comercial [13, 15, 16].

Formación de los heterodúplex

Para la formación de los heterodúplex se tomaron 5 µL del producto amplificado en la segunda ronda, correspondiente a la muestra de subtipo desconocido (100-250 ng de ADN) y se mezclaron con 5 µL del producto amplificado de cada uno de los diferentes subtipos de referencia (en diferentes tubos de reacción), en presencia de 1,1 µL de tampón de hibridación 10 X (NaCl 1 M, Tris 100 mM pH 7,8 y EDTA 20 mM). La mezcla se desnaturalizó 2 min a 94 °C en el termociclador PTC-100 (MJ Research Inc. E.U.A.) para separar las cadenas por calor e inmediatamente se enfrió en hielo para permitir la formación estable de los heterodúplex por el reconocimiento entre los fragmentos de ADN de la muestra y los de cada uno de los patrones [13, 15, 16].

Los heterodúplex formados se mezclaron con 3 µL de tampón de aplicación (bromofenol azul 100 mM y xylene cyanol 100 mM) y se aplicó en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante 5% (30:0,8 acrilamida-bisacrilamida) con tampón TBE (Tris 88 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM). Las muestras se hicieron migrar durante 6 h a voltaje constante de 200 V para la separación de los heterodúplex

formados y permitir determinar el subtipo de las cepas virales a partir de la determinación de sus movilidades electroforéticas relativas [13, 15, 16]. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0,5 g/µL, se observó en un transiluminador y se tomaron fotografías para facilitar el análisis de los resultados.

Análisis del heterodúplex

Para la determinación del subtipo a la muestra desconocida se midió la movilidad relativa como la distancia de migración de los dos heterodúplex (distancia del fondo del pozo al punto medio de las bandas de los dos heterodúplex) entre la distancia de migración de los homodúplex (distancia del fondo del pozo al punto medio de las bandas de los homodúplex).

$$\text{Movilidad de los heterodúplex} = \frac{\text{Distancia del fondo del pozo al punto medio de las bandas de los heterodúplex}}{\text{Distancia desde el fondo del pozo al punto medio de las bandas de los homodúplex}}$$

El reconocimiento entre ambos fragmentos de ADN genera la formación de los heterodúplex, cuya movilidad relativa en el gel de poliacrilamida se corresponde con la distancia genética entre el aislamiento viral desconocido y las cepas de donde provienen las secuencias utilizadas como subtipos de referencia. El heterodúplex que exhiba la mayor movilidad relativa es el que representa mayor homología con el patrón correspondiente. En la Figura 1 se muestra el protocolo de trabajo del HMA.

Resultados y Discusión

En la Tabla 3 se aprecia que los subtipos detectados en la muestra investigada fueron A, B y C. Predominó el subtipo B en 49 personas que representan 70% del total. Estos resultados se corresponden con los de estudios anteriores en los cuales se encontró también que la circulación de las cepas del subtipo B era predominante en la población cubana infectada [4].

Tabla 2. Subtipos de referencia utilizados como patrones en la realización del HMA.

Subtipo	Cepa VIH-1	País de origen	Fragmento clonado
A1	RW20	Ruanda	gp160
A2	IC144	Costa de Marfil	ED5/ED12
A3	SF170	Ruanda	gp160
B1	BR20	Brasil	gp160
B2	TH14	Tailandia	gp160
B3	SF162	E.U.A.	6,6Kb3'end
C1	MA959	Malawi	gp160
C2	ZM18	Zambia	ED5/ED12
C3	IN868	India	ED5/ED12
C4	BR25	Brasil	gp160
D1	UG21	Uganda	gp120
D2	UG38	Uganda	gp120
D3	UG46	Uganda	gp120
E1	TH22	Tailandia	gp160
E2	TH06	Tailandia	gp160
E3	CAR7	Rep. Centro Africana	ED5/ED12
F1	BZ162	Brasil	gp120
F2	BZ163	Brasil	gp120
G1	RU131	Rusia	ED5/ED12
G2	LBV21-7	Gabon	gp160
G3	V1525	Gabon	gp160
H2	V1557	Zaire	ED5/ED12

17. Bachmann MH, Delwart EL, Shpaer EG, Lingenfelter P, Singal R, Mullins JI, et al. Rapid genetic characterization of HIV type 1 strain from four World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites using a heterodúplex mobility assay. *AIDS Res Human Retrovir* 1994;10 (11):1345-53.

18. Bøyum A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964;204:7-4.

19. Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21 Suppl. (Paper IV):77-89.

20. Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. PCR 1 a practical approach series. Oxford: IRL Press at Oxford University Press; 1996.

21. Myers G, Hahn BH, Mellors JW, Henderson LE, Korber B, Jeang KT, et al. Human retrovirus and AIDS a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos: National Laboratory, Los Alamos, N. M.; 1995.

Tabla 3. Distribución del número de muestras clasificadas en cada uno de los subtipos.

Subtipos	Frecuencia	Por ciento
A	9	12,9
B	49	70
C	12	17,1
Total	70	100,0

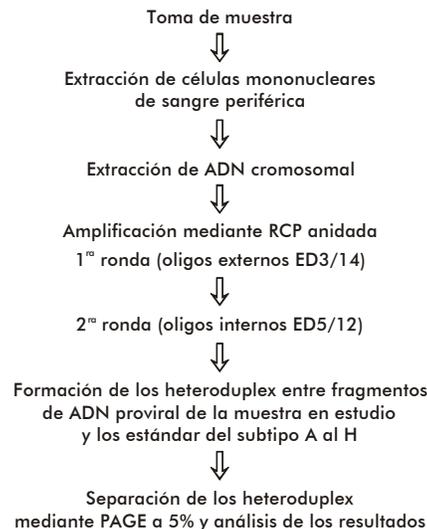


Figura 1. Protocolo de trabajo del ensayo de movilidad del heterodúplex.

Los subtipos A y C se encontraron en proporciones relativamente similares (12,9 y 17,1% respectivamente); es decir, que se mantienen en circulación cepas pertenecientes a dichos subtipos, aunque su difusión es menor que la de las cepas del subtipo B [5].

En la Tabla 4 aparece la distribución de los subtipos encontrados de acuerdo al posible lugar de contagio. Como se puede observar, la mayoría de las personas estudiadas adquirieron el VIH en Cuba y sólo 6 fueron infectadas en África. Dentro de los 64 infectados en Cuba predominó el subtipo B en 45 de ellos, que representan 70,3% de este grupo. Aparecen, además, personas con los subtipos A y C en las cuales no se pudo comprobar si tuvieron relación epidemiológica con personas infectadas en África. Aunque los subtipos A y C circulan fundamentalmente en la parte central del continente africano, su presencia fue detectada en Cuba en los últimos años. Anteriormente se había planteado que la difusión de estos subtipos en el país es limitada si se compara con el subtipo B. La explicación de esta situación pudiera estar relacionada con el hecho de que las personas que estuvieron en África en diferentes momentos, no pertenecían a grupos de alto riesgo [5].

En la Tabla 5 se aprecia la distribución de los subtipos encontrados de acuerdo con la orientación sexual de las personas infectadas. Tanto en los homobisexuales como en los heterosexuales existió predominio del subtipo B. Estos resultados corroboran que el predominio de este subtipo es propio de la población analizada, como ya se discutió en los resultados anteriores, e independiente de la orientación sexual de las personas que la componen.

Otros autores han encontrado una asociación significativa entre homobisexuales y el subtipo B y a su vez plantearon que la puerta de entrada principal de este subtipo en Cuba fue a través de un grupo de homobisexuales que estuvieron relacionados epidemiológicamente con un individuo infectado en los E.U.A. [4]. No se detectó la introducción de otros subtipos virales en la población estudiada.

En la Figura 2 se muestra el protocolo para la obtención de heterodúplex a partir de una cepa del subtipo B y de los patrones correspondientes. El de mayor homología fue el que correspondió al patrón B₂. La mayoría de las cepas clasificadas como subtipo B mostraron un patrón semejante al de la Figura 2, donde el heterodúplex se ve como una sola banda fina. Como se

Tabla 4. Distribución de los subtipos encontrados de acuerdo al posible lugar de contagio de las personas infectadas.

Lugar de contagio	Subtipos			Total
	A	B	C	
Cuba	9	45	10	64
África	0	4	2	6
Total	9	49	12	70

Tabla 5. Distribución de los subtipos encontrados teniendo en cuenta la orientación sexual de las personas infectadas.

Orientación sexual	Subtipos			Total
	A	B	C	
Homobisexuales	6	35	6	47
Heterosexuales	3	14	6	23
Total	9	49	12	70

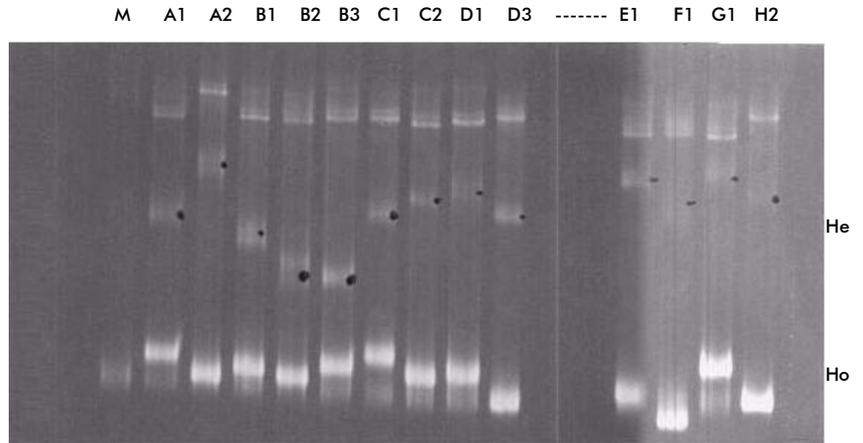


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% donde se muestran los heterodúplex formados a partir del ADN y la cepa viral del paciente con los patrones de cada subtipo, respectivamente (A-H) observándose mayor homología con el patrón B₃, ya que exhibe una mayor movilidad en el gel. He (heterodúplex), Ho (homodúplex), M (muestra del paciente sin formar heterodúplex).

ha descrito [13, 15], los heterodúplex pueden tomar la forma de bandas finas en el gel o aparecer como una serie de bandas continuas que semejan una mancha en función del nivel de complejidad de la cuasiespecie viral, es decir, que en este estudio las cepas encontradas como subtipo B no parecen mostrar un alto grado de divergencia con respecto a otras cepas del mismo subtipo, lo que se podría explicar si se tiene en cuenta que las personas que participaron en el estudio fueron infectadas en fecha reciente, por lo que dichas cepas aún no han sido sometidas a una fuerte selección *in vivo*.

Algo diferente a lo observado entre las cepas cubanas cuyo subtipo se determinó como B se aprecia en las Figuras 3 y 4, donde se muestran ejemplos de electroforesis con heterodúplex formados entre cepas cubanas clasificadas como subtipos A y C, y los correspondientes patrones A₂ y C₃, respectivamente. En ambos casos los heterodúplex se observan como dos bandas separadas, lo cual se vió en el resto de las cepas clasificadas como A y C. Estos resultados pudieran indicar que entre las cepas de estos subtipos existe una mayor divergencia con respecto a sus patrones correspondientes: o sea, que hay una mayor diversidad

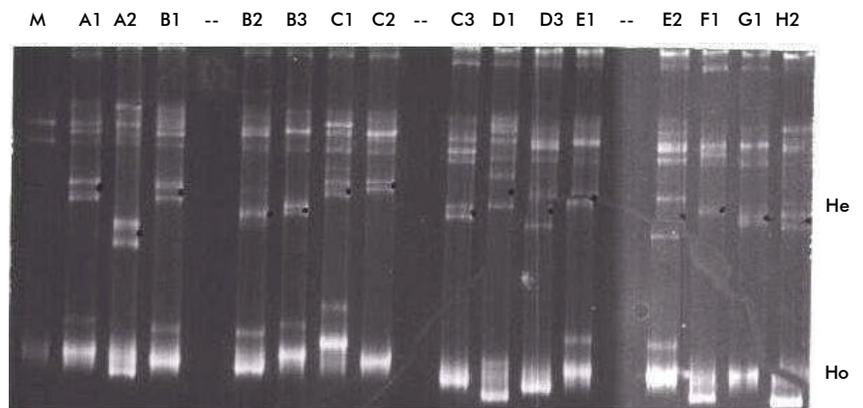


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% donde se muestran los heterodúplex formados a partir del ADN y la cepa viral del paciente con los patrones de cada subtipo respectivamente, observándose mayor homología con el patrón A₂. He (heterodúplex), Ho (homodúplex), M (muestra (ADN) del paciente sin formar heterodúplex).

intrasubtipo, lo que pudiera sugerir que dichas cepas han circulado durante más tiempo entre la población infectada. Nájera y colaboradores [2] plantearon que las relaciones entre los virus en una región geográfica concreta estaban vinculadas con el tiempo que el virus llevaba circulando en esa población y el número de cepas que iniciaron la difusión en esa región. Si tomamos en cuenta que la epidemia en Cuba se debe haber iniciado a finales de la década de 1970 con el regreso de los colaboradores cubanos de África, y que ésta fue precisamente una vía de entrada para estos subtipos virales, se podría explicar la mayor diversidad encontrada para los subtipos A y C provenientes de África, donde la epidemia se inició primero [21]. Blanco y colaboradores en un trabajo no publicado aún, describieron que las secuencias nucleotídicas de las cepas de los subtipos A y C mostraron mayor diversidad en relación con las cepas del subtipo B [5].

El HMA es un método válido para determinar el genotipo de cepas de VIH-1 de forma rápida y sencilla. Los resultados que se obtuvieron coinciden con los informados por otros autores en Cuba con el empleo de otros métodos. Se demostró que hay predominio del subtipo B en la muestra investigada.

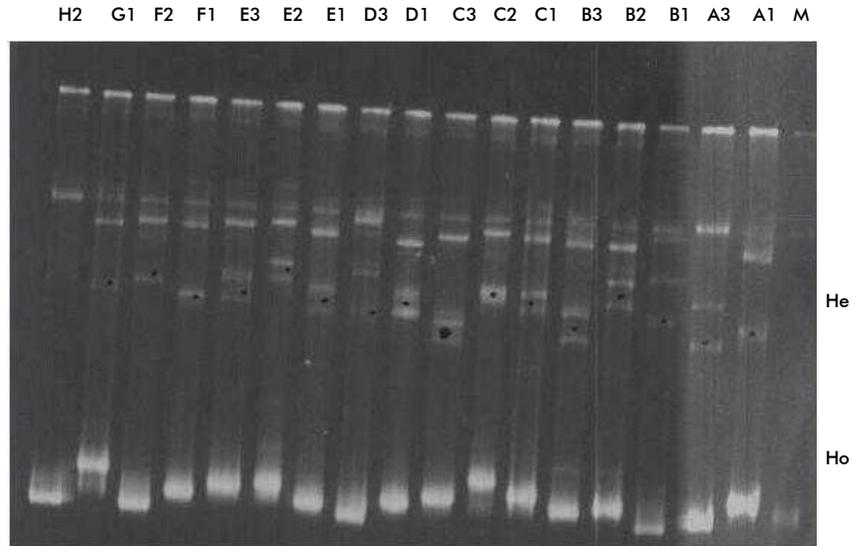
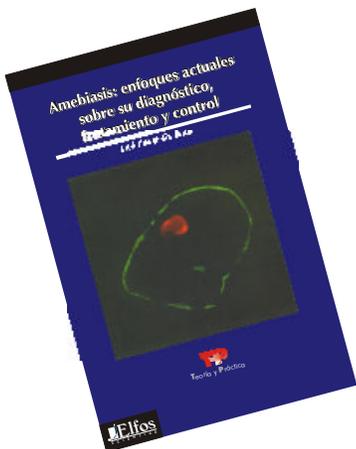


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% donde se muestran los heterodúplex formados a partir del ADN y la cepa viral del paciente con los patrones de cada subtipo respectivamente (A-H), observándose mayor homología con el patrón C3. He (heterodúplex), Ho (homodúplex), M (muestra (ADN) del paciente sin formar heterodúplex).

Recibido en noviembre de 2000. Aprobado en marzo de 2001.



Amebiasis: enfoques actuales sobre su diagnóstico, tratamiento y control

Luis Fonte Galindo

ISBN 959-235-018-3



Teoría y Práctica

El estado de los conocimientos en relación con la amebiasis ha cambiado en los últimos años. Los criterios morfológicos que servían de base para la identificación de *Entamoeba histolytica* en las heces de los individuos infectados, han perdido exclusividad ante la certeza de que a ellos responden dos categorías taxonómicas diferentes desde los puntos de vista bioquímico, inmunológico y genético: *E. histolytica* y *E. dispar*. Este libro emplea una terminología asequible al mayor número de lectores, evita academicismos innecesarios y pretende devenir aporte a la necesaria actualización de los conocimientos sobre amebiasis del personal relacionado con el diagnóstico, tratamiento y control de esta parasitosis, poniéndolos al nivel que han adquirido mundialmente en la última década.

El autor, Dr. Luis Fonte Galindo, es investigador del Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí», de La Habana, trabaja desde 1990 en el desarrollo de procedimientos para el diagnóstico de la amebiasis. El Dr. Fonte ha publicado más de treinta artículos científicos relacionados con la quimioprophilaxis de la malaria y el inmunodiagnóstico de enfermedades parasitarias.

Entre otros temas...

- ❖ Amebas y amebiasis: aspectos conceptuales e históricos
- ❖ Entamoeba histolytica: aspectos de su biología
- ❖ Entamoeba histolytica: marcadores de patogenicidad
- ❖ Entamoeba histolytica: factores de virulencia
- ❖ Formas clínicas de la amebiasis
- ❖ Diagnóstico de la amebiasis
- ❖ Tratamiento de la amebiasis
- ❖ Prevención y control de la amebiasis



Envíe su solicitud a:
 Elfos Scientiae
 Apartado 6072,
 La Habana 6, Cuba.
 Tel.: (53-7) 33 1917
 Fax: (53-7) 33 1917
 E-mail: elfos@cigb.edu.cu
<http://www.elfoscientiae.com.cu>

Precio: \$20.00 USD