

## Resúmenes de trabajos libres presentados en el:



# III Simposio Nacional de Virología

## Prevalencia serológica y aislamiento del herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca

Ruiz-Sáenz J<sup>1</sup>, Jaime J, Vera V<sup>2</sup>

### INTRODUCCIÓN

El herpesvirus bovino es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, el cual afecta naturalmente al bovino, en el que provoca un amplio espectro de manifestaciones conocidas como rinotraqueítis, vulvovaginitis, balanopostitis, conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis acarreando graves pérdidas económicas. En nuestro país, ha sido reportado desde comienzos de los 70 y aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de las principales limitantes de las explotaciones ganaderas del país.

### OBJETIVO

Desarrollar un estudio serológico de la presencia del BHV-1 en dos sistemas de producción ganadera de leche y carne; para posteriormente mediante inmunosupresión terapéutica intentar aislamientos virales.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Para ello, se realizó un estudio serológico transversal en el cual se muestrearon 316 individuos no vacunados pertenecientes a 6 diferentes haciendas ganaderas; tres de ellas dedicadas a la producción de leche, ubicadas en el departamento de Antioquia y las 3 restantes dedicadas a la ceba de ganado destinado al faenado ubicadas en el departamento del Valle del Cauca. A los individuos se les tomó una muestra de sangre mediante punción en la vena coccígea media. Luego, las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio donde se separaron los sueros y se realizó la prueba de seroneutralización viral en cultivo celular. A partir de dichos resultados se escogió a los animales que tuvieran los mayores títulos seroneutralizantes del hato, los cuales fueron sometidos a inmunosupresión terapéutica con una dosis única de 200mg de dexametazona para posteriormente tratar de aislar el virus en muestras de estos.

### RESULTADOS

Se encontró un 100% de prevalencia serológica por hato para el BHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75.63%. La prevalencia para los departamentos de Antioquia y del Valle fue del 85.51% y 69.84% respectivamente. Se inmunosuprimieron 15 animales del valle y 9 de Antioquia a los cuales se le tomó muestra respiratoria, ocular y reproductiva, para un total de 72 muestras, las cuales se llevaron a cultivo celular. Se logró aislar virus de todas las muestras; siendo posible recuperar virus tanto de toros como de vacas tratadas. Se recuperaron un total de 10 cepas virales, 7 de ellas pertenecientes al departamento del valle y las 3 restantes al de Antioquia. De las cepas aisladas, 4 fueron recuperadas de tracto reproductivo y las restantes fueron recuperadas de tracto respiratorio (Muestras oculares y nasales). Utilizando la técnica de DICC50% se realizó la titulación de una de las cepas proveniente de tracto reproductivo de un toro del valle del cauca, encontrándose un título viral de  $1 \times 10^{5.51}$  DICC50%.

### CONCLUSIONES

Los presentes resultados se relacionan con un estado de enzootia de la infección y demuestran que el BHV-1 sigue siendo uno de los agentes de mayor difusión en diferentes ámbitos ganaderos, y que tanto machos como hembras están siendo afectados por esta infección. Adicionalmente, si tenemos en cuenta la larga convivencia con la infección en el país permiten cuestionar la eficacia de los sistemas de prevención y control de la infección en Colombia.

---

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá., E- mail: julianruizsaenz@gmail.com

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

---

## Reproducción experimental y caracterización molecular de cepas de campo del virus de herpesvirus bovino tipo 1 aisladas en Colombia

Jenny J. Chaparro<sup>1</sup>, Diego Piedrahita<sup>2</sup>,  
Gloria C. Ramírez N.<sup>2</sup>,

Víctor J. Vera A.<sup>3</sup>, Luis Carlos Villamil J.<sup>4</sup>

## OBJETIVO

Reproducir experimentalmente, la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) a partir de una cepa de herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) aislada de un hato bovino aparentemente sano con antecedentes de seroconversión. Caracterizar genómicamente, la cepa empleada y 2 aislamientos colombianos de HVB-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la reproducción experimental, se empleó una cepa de campo de HVB-1 (Sabana de Bogotá) y una de referencia IOWA; fueron replicadas en células MDBK y en córnea fetal bovina e inoculadas vía respiratoria, en 7 terneros seronegativos al virus HVB-1 y observados durante 15 días, separándose en tres unidades: 4 animales inoculados con cepa de campo, (dos inmunosuprimidos con 0.1 mg/kg de dexametasona); 1 ternero control positivo y 1 ternero control negativo. La dosis inoculada fue:  $2 \times 10^5$  DITC50%/animal, (2ml por fosa nasal). Se hizo examen clínico, prueba de anticuerpos seroneutralizantes (SN) e intento de aislamiento viral diariamente a partir de hisopos: nasal, conjuntival, vaginal y de suero sanguíneo y lavado prepucial. Todos los animales fueron sacrificados y sometidos a necropsia tomándose muestras para histopatología e inmunoperoxidasa. Los resultados fueron analizados utilizando estadística descriptiva. Se caracterizaron tres aislamientos virales del BHV-1, con enzimas de restricción comparándolos con cepas de referencia (Iowa y Colorado). Se hizo: amplificación por PCR de glicoproteínas del BHV-1, análisis por RFLPs.

## RESULTADOS

Los animales inoculados presentaron sintomatología clínica, más severos en los inmunosuprimidos: lesiones en mucosas al 9 pi, recuperándose virus de las muestras de hisopo nasal hasta el 10 pi; a partir del día 8 pi, anticuerpos neutralizantes con títulos de 1/8 a 1/64. Lesiones macroscópicas: en tracto respiratorio anterior, con congestión y aumento de ganglios linfáticos regionales. Microscópicamente: rinitis supurativa mixta multifocal con edema y moderada muerte celular del epitelio y en algunos casos pérdida de cilias, con severa hiperplasia y expansión de los centros germinales de los ganglios linfáticos en la zona paracortical y regiones reticulares con infiltración de PMN. En la caracterización molecular: extracción de DNA por proteinasa K/SDS-Fenol Cloroformo; se amplificaron por PCR las diferentes glicoproteínas del virus, empleando primers que diferencian HVB-1 de otros

herpesvirus, se secuenciaron (ABI, Prim 310 APPLIED BIOSYSTEMR) y se compararon con reportes del Gene Bank con homologías del 100%. Sobre amplificadas de gpB, se realizó el PCR-RFLP, empleando Hind III, clasificando dos de las cepas como HVB-1.2a y una como HVB-1.1.

## CONCLUSIONES

Se comprobó el efecto patógeno de la cepa de campo HVB-1 y se describió por primera vez en Colombia, un cuadro clínico progresivo de la enfermedad en su forma respiratoria; los terneros inmunosuprimidos fueron severamente afectados, lo cual sugiere un posible efecto sinérgico entre la inmunosupresión causada iatrogénicamente y la asociada a la infección por HVB-1. La caracterización molecular, permitió establecer, que las cepas corresponden a subtipos de origen respiratorio y genital lo que implica el inicio de un estudio de aislamiento y clasificación de cepas de campo por regiones naturales, para hacer más eficientes los programas de control de la enfermedad.

1. MV, MSc, PhD Línea de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia

2. MV, MSc, PhD Posgrado Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia

3. MV, MSc, PhD Posgrado Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia  
1 MV, MSc, PhD Universidad de la Salle

Correspondencia: Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

E-mail: vjveraa@unal.edu.co

## Relación filogenética y biogeográfica del virus del dengue tipo 3 en Latinoamérica

Christian Julián Villabona-Arenas,<sup>1,2</sup> Daniel Rafael Miranda-Esquivel<sup>2</sup> y Raquel Elvira Ocazonez<sup>1</sup>

## OBJETIVO

Determinar la relación filogenética y biogeográfica del DENV-3 en Latinoamérica

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se secuenció el gen de la envoltura viral de 21 cepas de DENV-3 Colombianas aisladas en un periodo de siete años (2001-2007) en los departamentos de Norte de Santander,

Santander y Valle del Cauca. Utilizando las secuencias locales junto con las secuencias disponibles para aislados DENV-3 en Latinoamérica disponibles en GenBank se llevaron a cabo análisis bajo el criterio de optimización de Máxima Verosimilitud (ML) y con múltiples costos bajo el criterio de optimización de Parsimonia. Cepas representativas de los distintos genotipos se usaron como grupo externo. Para reconstruir la historia de la distribución del DENV-3 en Latinoamérica, se llevó a cabo un análisis de dispersión-vicarianza utilizando la topología de ML y como criterio de distribución las regiones geográficas donde se aislaron las cepas: Caribe, Centroamérica, Noreste de Suramérica, Norte de Suramérica, Pacífico y Sureste de Suramérica.

## RESULTADOS

En todos los análisis se obtuvo el mismo cladograma en términos de agrupación de países. Las cepas de Latinoamérica agruparon con la cepa de Sri-Lanka lo cual sugiere que todas pertenecen al genotipo III. El análisis de ML mostró que los virus que han circulado en Latinoamérica desde 1994 pueden ser agrupados en cinco grupos: clado I con cepas de Centroamérica y México, clado II con las cepas restantes de México, clado III con cepas de Colombia (Departamentos de Norte de Santander y Santander) y Venezuela, clado IV con cepas de Colombia (Departamento de Valle del Cauca y una cepa de Santander) Cuba, Ecuador y Perú y clado V con cepas de Argentina, Cuba, Bolivia, Brasil, Martinica y Paraguay. El análisis biogeográfico mostró tres posibles escenarios biogeográficos que representan las áreas ancestrales (áreas donde se encontraba distribuido el ancestro común a los clados en cuestión) más probables para todas las cepas de DENV-3 en Latinoamérica. La optimización para el resto de clados presentó como áreas ancestrales más probables a Centroamérica para los clados I, II y III, el Pacífico para el clado IV y la unión Caribe-Sureste de Suramérica para el clado V.

## CONCLUSIONES

La proximidad geográfica estuvo ligada a los grupos resultantes en los análisis filogenéticos, por tanto, la mayor parte de las cepas que aparecieron en un mismo clado representaron aislados de países vecinos especialmente en la zonas de frontera como Colombia/Santander-Venezuela y Colombia/Valle del Cauca/Pacífico. En las distintas reconstrucciones ancestrales, Centroamérica es el área ancestral más probable y junto con los hallazgos filogenéticos sugieren que tras la introducción del serotipo en esta región 1994, el

DENV-3 se ha ido desplazando y diversificando a través de todo el continente. Teniendo en cuenta la estructura filogenética y la distribución espacio-temporal de las cepas, los datos sugieren que han ocurrido múltiples eventos biogeográficos que explican el patrón de distribución del DENV-3 y que para entender la dinámica del virus se requiere un enfoque regional en vez de una perspectiva por países.

1. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales y Centro de Investigaciones Epidemiológicas, Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguara Km 2 Autopista Piedecuesta-Santander, Colombia  
2. Grupo de Estudios en Biodiversidad, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27, calle 9 Bucaramanga-Santander, Colombia  
Correspondencia: Laboratorio de Arbovirus, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander. Sede Guatiguara Km 2 autopista a Piedecuesta. Colombia. E-mail: dmiranda@uis.edu.co

## Filogenia del virus fiebre amarilla en Colombia

Jairo A. Méndez R.<sup>1,2</sup>, Catalina Méndez<sup>1</sup>, Cristina Domingo<sup>3</sup>, Gloria J. Rey<sup>1</sup>, Juan A. Sánchez<sup>4</sup> & Antonio Tenorio<sup>3</sup>.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la fiebre amarilla pertenece a la familia Flaviviridae, género flavivirus, y es el responsable de una enfermedad hemorrágica aguda que aún hoy en día afecta a más de 200.000 personas al año en regiones tropicales de África y Sudamérica. En Colombia, la fiebre amarilla ha desempeñado un importante papel histórico y actualmente representa una de las enfermedades de mayor impacto para la salud pública ya que regularmente se detectan casos selváticos fulminantes a pesar de las medidas de control realizadas por el estado. Aunque la vigilancia epidemiológica del evento puede realizarse mediante pruebas serológicas o virológicas, estas no ofrecen ninguna información acerca del origen geográfico o evolutivo del virus, ni permiten determinar el genotipo viral detectado.

## OBJETIVO

Realizar un análisis filogenético de los virus fiebre amarilla que han circulado y que circulan actualmente en Colombia, para determinar la presencia y distribución de variantes genéticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Siete sueros humanos de pacientes diagnosticados con fiebre amarilla obtenidos entre 1954 y 1974 fueron procesados con el QIAamp Viral RNA Minikit, y 14 muestras de tejido hepático obtenidas entre 2003 y 2008 fueron procesadas usando el reactivo Trizol-LS para extracción del RNA viral, el cual fue usado como templado en una reacción de Transcripción Reversa (RT) seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores diseñados para amplificar un fragmento de 734pb de la región prM/E. Las muestras negativas fueron reamplificadas utilizando iniciadores internos (PCR anidada) para obtener un producto de 692pb. Una vez secuenciados los fragmentos, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el algoritmo basado en distancia Neighbor Joining (NJ) y análisis de Máxima Verosimilitud (ML) incorporados en el programa PAUP\* 4.0.

## RESULTADOS

La topología de los árboles construidos muestra un agrupamiento bien definido que indica la presencia de al menos 2 variantes génicas, una de las cuales se relaciona estrechamente con virus africanos que no se habían reportado previamente en Sudamérica, y otra correspondiente al genotipo americano II que circula principalmente en Brasil.

## CONCLUSIONES

El análisis de la región génica prM/E permitió demostrar la co-circulación de 2 genotipos del virus fiebre amarilla en diferentes áreas geográficas de Colombia, lo que indica además de la variabilidad de las cepas virales que circulan en nuestro territorio, un flujo genético con países limítrofes, así como la posibilidad de circulación selvática de cepas ancestrales con patrones de evolución independientes.

1 Instituto Nacional de Salud (INS), Laboratorio de Virología, Bogotá, Colombia.

2 Universidad de los Andes, Departamento de Microbiología, Bogotá, Colombia.

3 Laboratorio de Enfermedades Viricas Importadas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

4 Universidad de los Andes, laboratorio BIOMMAR, Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Jairo A. Mendez R. Instituto Nacional de Salud. Laboratorio de Virología. Avenida/Calle 26 # 51-20 CAN, Bogotá. E-mail: jmendez@ins.gov.co

## Variantes moleculares del ORF E7 del virus de papiloma humano tipo 58 en la cohorte de Bogotá, Colombia. Reporte preliminar

Oscar Buitrago<sup>1,2</sup>, Carolina Martín<sup>1,2</sup>, Antonio Huertas<sup>1</sup>, Pablo Moreno<sup>1</sup>, Gustavo Hernandez<sup>3</sup>, Teresa Martinez<sup>3</sup>, Mónica Molano<sup>1,2</sup>

## INTRODUCCIÓN

El VPH58 es el segundo tipo viral de mayor incidencia en el ámbito Suramericano y Nacional en mujeres con citología normal y con lesiones de alto grado. Además este virus se encuentra dentro de los ocho tipos virales más altamente prevalentes en cáncer cervical invasivo. A nivel mundial hay muy pocos estudios de variantes sobre los ORF E6 y E7 del VPH58, de los cuales algunos han mostrado una asociación entre ciertas variantes moleculares con la severidad de la neoplasia cervical y con el riesgo de cáncer cervical. Sin embargo en el país no se han desarrollado estudios de variantes moleculares en E7/VPH58.

## OBJETIVO

Determinar variantes moleculares en E7/VPH58 en muestras de mujeres positivas para VPH58 en la línea de base de la cohorte de Bogotá, Colombia

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cepillados cervicales de 1845 mujeres con citología normal pertenecientes a la línea de base de la cohorte de Bogotá, Colombia. La detección y tipificación del VPH presente en las muestras se realizó mediante PCR utilizando los iniciadores P5+/GP6+ y la tipificación de 37 diferentes tipos virales se realizó mediante un inmuno-ensayo (PCR-EIA). Se amplificó la región E7 del VPH 58 en cepillados cervicales de mujeres positivas para VPH58 usando los iniciadores E7P1- E7P2 que amplifican un fragmento de 316 pb comprendido entre el nucleótido 561 al 877, y que abarca la región completa del ORF E7. Para el análisis de las variantes se utilizó la técnica de secuencia automática directa. La secuencia referencia del VPH58 se utilizó para comparar las secuencias obtenidas.

## RESULTADOS

34 muestras mujeres fueron positivas para VPH 58. De 13 muestras que han sido analizadas para la presencia de variantes en E7 VPH 58, 12 tienen la variante A694/G744/A761 (94.7%), una muestra presenta la variante A599/A694/G744/A761 (5,5%), y ninguna de las muestras presenta la secuencia referencia del VPH58.

## CONCLUSIÓN

En las muestras analizadas se presentaron dos variantes, una previamente reportada en la literatura en una población Asiática A694/G744/A761 y una nueva variante A599/A694/G744/A761 nunca antes reportada. Se observa poca diversidad de variantes de E7 del VPH 58 en las muestras analizadas. Se debe continuar con los análisis de toda la cohorte para analizar el papel que juegan estas variantes en la persistencia de la infección.

1. Grupo de Investigación en Biología del Cáncer. Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

2. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

3. Grupo Investigación Epidemiológica. Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Calle 14 # 108-97 Casa 201, Parques Residenciales Sabana Grande - Etapa 1B. Bogotá, Colombia. E-mail: olbuitragou@unal.edu.co; antaresmilo28@hotmail.com

## **Identificación del genotipo y las mutaciones G1896A y A1762T/G1764A en el segmento precore/core de virus de la hepatitis B aislados de pacientes con diagnóstico de cirrosis y/o carcinoma hepatocelular**

Fabián M. Cortés-Mancera<sup>1</sup>, Carmen L Loureiro<sup>2</sup>, Juan Carlos Restrepo<sup>1,3</sup>, Sergio Hoyos<sup>1,3</sup>, Gonzalo Correa<sup>1,3</sup>, Helene Norder<sup>4</sup>, Flor Pujol<sup>2</sup>, María-Cristina Navas<sup>1</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Ocho genotipos han sido descritos para el Virus de la Hepatitis B (HBV), designados A-H; de los cuales F y H son considerados genotipos autóctonos del continenteamericano. Recientemente fue publicado un trabajo de genotipificación realizado en muestras de

donantes de sangre de Bogotá y Bucaramanga, en el cual se describió una alta prevalencia del genotipo F (<80%). De interés particular, en dos estudios separados se asoció la infección por el genotipo F con mayor desarrollo de HCC y alta tasa de mortalidad. El ciclo de replicación del HBV incluye una molécula intermediaria de ARN (pgARN); dado que la transcripción de pgARN esta regulada por el promotor core (BCP), corriente arriba del ORF precore/core (pre-C/C), la variante G1896A en Pre-C y la doble mutación en BCP (A1762T/G1764A) resultan en alteraciones del ciclo de replicación; algunos autores han reportado alta frecuencia de A1762T/G1764A en casos de HCC.

## OBJETIVO

Caracterizar el genotipo y las variantes precore/core del Virus de la Hepatitis B provenientes de pacientes con diagnóstico de cirrosis y carcinoma hepatocelular.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Fueron incluidos 134 pacientes con diagnóstico de cirrosis y/o HCC, atendidos en la unidad de Hepatología del Hospital Pablo Tobón Uribe en el periodo 2005-2007. A partir de esta población, se analizaron muestras de suero y/o explante hepático en 15 pacientes con antígeno de superficie positivo (HBsAg); 10 de ellos con diagnóstico de cirrosis y 5 con diagnóstico de HCC y cirrosis concomitante. Caracterización molecular del HBV. Inicialmente, a partir del ADN extraído (TRIzol Ls), se evaluó la presencia del HBV mediante PCR del gen S. En aquellas muestras positivas, se amplificó el genoma viral completo. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados. Una vez descartados eventos de recombinación (Simplot), las secuencias fueron alineadas con prototipos en GenBank (Clustalx) para determinar las mutaciones en pre-C/C. La inferencia filogenética se realizó utilizando máxima parsimonia, Neighbor Joining (PAUP 4.0) y análisis Bayesiano (Mr Bayes).

## RESULTADOS

En 8 muestras se amplificó el gen S (5 tejidos y 3 sueros), y en 4 de estas, el genoma viral completo. Según el análisis de la secuencia del gen S, todos los aislados se agruparon dentro del genotipo F. El secuenciamiento del genoma completo de 4 aislados permitió identificar el subgenotipo F3 en 3 muestras (2 muestras de pacientes colombianos y 1 de un paciente venezolano) y el subgenotipo F1 en 1 muestra (origen El Salvador). De estos aislados, uno presentó la mutación G1896A. La doble mutación A1762T/G1764A se detectó en otros 2

aislados; la presencia de esta doble mutación corresponde a muestras de pacientes con diagnóstico de HCC.

## CONCLUSIONES

Este es el primer estudio de genotipificación del HBV en casos de cirrosis y HCC en Colombia. El genotipo F, subgenotipo F3 se encontró en las 2 muestras de pacientes colombianos. Los subgenotipos identificados y su distribución geográfica coinciden con lo descrito en la literatura. La detección de la doble mutación A1762T/G1764A en casos de HCC coincide con lo descrito en otros estudios.

1. Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia,
2. Laboratorio de Virología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas,
3. Hospital Pablo Tobón Uribe.
4. Virology Department, Institute for Control Diseases, Solna, Suecia

Correspondencia: Grupo de Gastrohepatología. Sede de Investigaciones Universitarias, Universidad de Antioquia. Carrera 53 # 61-30, Torre 2, Laboratorio 434, Tel (00574) 2196567. Fax: (00574) 2196565. E-mail: fabiancortesm@yahoo.com

## **Asociaciones entre virus rábicos V3 (*Desmodus rotundus*) y V4 (*Tadarida brasiliensis*) con murciélagos no hematófagos de hábitos caseros que comparten refugio en el departamento del Valle del Cauca – Colombia**

Constanza Núñez Mejía<sup>1</sup>, Humberto Escobar Doncell<sup>2</sup>, Constanza Hernández Rojas<sup>3</sup>, Jhon Zapata Osorio<sup>3</sup> y Andrés Páez Martínez<sup>4,5</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La transmisión de rabia en murciélagos hematófagos ha sido muy estudiada pero la transmisión entre murciélagos no hematófagos no es bien conocida, dado que depende de las especies de murciélagos involucradas y tipo de relación entre estas en los refugios.

## OBJETIVO

Identificar las variantes de virus rábicos circulantes en las especies de murciélagos caseros citadinos y rurales y su asociación con las especies de murciélagos no hematófagos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las capturas de los murciélagos se realizaron utilizando redes de niebla, entre los años 1999-2008 en los 42 municipios del Valle del Cauca, en diferentes ambientes urbanos y rurales con antecedentes de quejas por mordedura de personas y animales e invasión en edificaciones. El diagnóstico del virus rabia se realizó por Inmunofluorescencia Directa e Inoculación en cerebro de ratón lactante y la tipificación viral por Inmunofluorescencia Indirecta usando anticuerpos monoclonales del CDC. La identificación taxonómica de los murciélagos se realizó utilizando la clave Walker's Bats of the world. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas de bioseguridad y manejo ético de animales.

## RESULTADOS

Se encontraron asociaciones entre los virus rábicos V3-V4 con murciélagos insectívoros caseros. Las especies *Molossus molossus*, *Eptesicus brasiliensis*, *Myotis nigricas*, *Saccopteryx bilineata*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Noctilio albiventris* y *Desmodus rotundus*, se encontraron compartiendo refugios como cuevas y edificaciones. Durante los años 1996 a 2002, los murciélagos *Molossus* y *Eptesicus* fueron positivos para la variante rábica V4 de *Tadarida brasiliensis*, principal murciélago citadino transmisor de rabia en las Américas. En abril de 2008, nuevamente coincidieron en un mismo refugio urbano estas dos especies de murciélagos insectívoros caseros infectados con la variante V4.

## CONCLUSIONES

La dispersión y prevalencia de V3-V4 en murciélagos no hematófagos de hábitos caseros en el Departamento del Valle del Cauca, es influenciado por la deforestación y arquitectura urbana que provee refugios a murciélagos citadinos y rurales, contribuyendo al contacto corporal entre especies. Adicionalmente, el comportamiento de los murciélagos, aerosoles y mordeduras ocasionados entre estos intervienen en la transmisión de rabia cuando comparten refugios.

1. Area de Virología, Grupo VIREM, Universidad del Valle  
 2. Secretaria de Salud Departamental del Valle  
 3. Unidad Ejecutora de Saneamiento del Valle del Cauca  
 4. Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C  
 5. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá D.C.  
 Correspondencia: Constanza Nuñez Mejía. Calle 12B # 59-31  
 Bloque 14 Apto 401. E-mail: colenume@yahoo.com

## Evidencia serológica de agentes emergentes en roedores urbanos y rurales de Antioquia, Colombia

Juan D. Rodas<sup>1</sup>, Andrés Londoño<sup>1</sup>, Víctor H. Quiroz<sup>1</sup>,  
 Javier Díaz<sup>2</sup>, Jorge E. Osorio<sup>3</sup>, Piedad Agudelo<sup>4</sup>,  
 Margarita Arboleda<sup>4</sup>, Silvana Levis<sup>5</sup>

### INTRODUCCIÓN

En las últimas tres décadas se han descubierto más de 20 arenavirus y 15 hantavirus en el continente Americano. La mayoría de estos “virus emergentes” comparten semejanzas estructurales y biológicas, tales como poseer envoltura, genomas ARN segmentados de polaridad negativa y roedores como reservorios primarios. Entre el 2004 y 2006, se demostró la presencia de IgG por una prueba de ELISA contra virus Sin Nombre en sueros humanos, y de roedores capturados en el departamento de Córdoba (13,5% y 2,1% respectivamente). Coincidentalmente, en el 2006 y 2008, se presentaron en el Urabá Antioqueño 2 brotes de síndrome pulmonar humano que se “confundieron” con hantavirus y posteriormente se diagnosticaron como *Rickettsia rickettsii*, estimulando nuestra curiosidad por investigar la posibilidad de etiología viral en síndromes hemorrágicos y respiratorios “indiferenciados” detectados en la mencionada zona.

### MATERIALES Y MÉTODOS

En agosto del 2007 iniciamos capturas de roedores en las poblaciones de Apartado, Turbo y Necoclí, utilizando 50 trampas Sherman y 15 trampas Tomahawk, con una frecuencia de 3 noches por semana, una semana cada mes, siguiendo evidencias de presencia de roedores o condiciones ecológicas apropiadas para su aparición. Los animales capturados fueron angrados y se obtuvieron muestras de bazo, hígado, riñón y pulmón para búsqueda de RNA viral. Simultáneamente se captaron sueros humanos de fase aguda y convaleciente, de pacientes

con fiebres hemorrágicas negativas por extendido a Malaria. Durante los últimos 6 meses hemos trabajado en la estandarización de técnicas de ELISA y RT-PCR para la detección de Robovirus (virus transmitidos por roedores) y Leptospira (no discutido aquí).

### RESULTADOS

En 12 salidas de campo, hemos capturado un total de 321 roedores, de los cuales 117 son *Ratus rattus*, 24 *Ratus norvegicus*, 71 *Mus musculus*, 87 de la subfamilia Sigmodontinae, 18 de la familia Echymidae, 3 son *Heteromys* sp y 1 más está aún por identificar. En breve, con la ayuda de mastozoólogos y métodos morfométricos determinaremos el género y la especie de los animales capturados. Usando un ELISA rápido para detección de IgG contra el virus Sin Nombre (SNV) (donación del Dr. Tony Schountz, Northern Colorado University), hemos encontrado 10 roedores Sigmodontinos positivos, de los cuales 5 también resultaron positivos a un ELISA no comercial para anticuerpos contra el virus Maciel (INEVH, variante apatógena de los hantavirus suramericanos). Ninguno de los sueros reactivos para hanta, mostró reacción cruzada con Arenavirus (Junin), por ELISA. 250 muestras de suero humanas, aún no han sido evaluadas para anticuerpos.

### CONCLUSIONES

Estamos desarrollando las pruebas para detección de IgG contra arenavirus (Junin y LCMV) y hantavirus (Maciel) en todas las muestras restantes de roedores y humanos. Esperamos detectar secuencias propias de Arena y hantavirus, para establecer la presencia de roedores persistentemente infectados y posibles diseminadores a la población humana. Pretendemos desarrollar una red de investigación nacional para determinar el papel que los Robovirus podrían estar jugando en la salud pública humana y establecer el posible sub-diagnóstico, debido a la carencia de pruebas, en casos humanos compatibles.

1. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Universidad de Antioquia  
 2. Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia  
 3. School of Veterinary Medicine, Pathobiological Sciences, University of Wisconsin  
 4. Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES, Medellín  
 5. Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH), en Pergamino, Argentina.  
 Correspondencia: Juan David Rodas G. Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro SIU. Laboratorio 233, Telefax: 2196525. E-mail: juandavid.rodas@gmail.com

# Genotipificación del virus de la hepatitis C en muestras de pacientes multi-transfundidos

Diana di Filippo<sup>1</sup>, Fabián M. Cortés-Mancera<sup>1</sup>, Mauricio Beltrán<sup>2</sup>, María Patricia Arbelaez<sup>3</sup>, Sergio Jaramillo<sup>4</sup>, Jorge Donado<sup>4</sup>, María-Cristina Navas<sup>1</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la población de pacientes multi-ransfundidos representa uno de los principales grupos de infección por el Virus de la Hepatitis C (VHC). Un estudio de corte transversal realizado en 500 pacientes multi-transfundidos atendidos en 4 centros hospitalarios en las ciudades de Bogotá y Medellín, reportó una prevalencia general de infección del 9,0%. La prevalencia por grupo fue 32,2% en pacientes con hemofilia, 6,1% pacientes sometidos a hemodiálisis, 7,1% pacientes con diagnóstico de anemia depreanocítica o talasemia, 2,6% pacientes con sangrado agudo y 3,4% pacientes con enfermedades oncológicas.

## OBJETIVO

Caracterizar el genotipo y subtipo del VHC en muestras obtenidas de pacientes multi-transfundidos de las ciudades de Bogotá y Medellín, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 45 muestras de suero provenientes de pacientes multi-transfundidos anti-HCV positivos (Abbot Asxym). Después de la extracción del Acido ribonucleico (ARN) (TRIzol®), la detección del genoma viral se realizó utilizando primers específicos para la región 5'UTR (Untranslated region) por RT-PCR anidada. Los productos amplificados fueron digeridos por separado en reacciones individuales con las enzimas de restricción MvaI, RsaI, HinfI a 37°C y BstUI a 60°C. Los genotipos y subtipos fueron deducidos a partir de patrones de RFLP descritos previamente por Pujol FH y col (1997). Para confirmar estos resultados, algunos aislados fueron evaluados por secuenciamiento y análisis filogenético usando metodologías de máxima verosimilitud y neighbor joining (PAUP 4.0).

## RESULTADOS

En un análisis previo realizado hace 3 años en las mismas muestras, la frecuencia de detección del genoma viral fue del 60% en las muestras anti-HCV positivas. Sin embargo, en este estudio el ARN fue detectado en solo 12 (26,6%) de las 45 muestras; el largo período de almacenamiento podría ser la razón de este resultado. Las 12 muestras de suero positivas por RT-PCR anidada fueron analizadas mediante la técnica RFLP. Basados en estos resultados, el genotipo predominante fue 1b (5, 41,68%), seguido por 1a (3, 25,01%), 2 (2, 16,7%) y 6c (2, 16,7%). De estos aislados, tres fueron analizados por secuenciamiento automatizado, usando diferentes métodos filogenéticos. Los resultados obtenidos fueron concordantes con el patrón de RFLP de las tres muestras (genotipo 1a, 1b y 2, respectivamente).

## CONCLUSIONES

En este estudio el genotipo 1 fue el predominante, como ha sido descrito en diversos estudios en el continente americano; adicionalmente, describimos el genotipo 2 y como hallazgo importante el genotipo 6. En estudios previos en diferentes ciudades de Colombia han sido descritos los genotipos 1, 2 y 4. La confirmación del genotipo 6 por secuenciación de la región 5'UTR está en proceso; es de mencionar que el patrón de RFLP de estas muestras fue 100% concordante con el patrón esperado según el análisis bioinformático de un aislado de este genotipo (HCV\_6c\_th846 GeneBank). Asimismo, está pendiente la identificación de los subtipos del genotipo 2 por secuenciamiento. La identificación del genotipo viral permite la elección del esquema de tratamiento antiviral, dada la resistencia de los genotipos 1 y 4 al tratamiento con IFN y permite conocer la epidemiología molecular del VHC en nuestro país.

1. Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia
  2. Coordinación Bancos de Sangre, Instituto Nacional de Salud
  3. Grupo de Epidemiología, Universidad de Antioquia
  4. Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia
- Correspondencia: María Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Carrera 53 # 61-30 Torre 2, Laboratorio 434, SIU, Universidad de Antioquia.  
E-mail: mcnavasn@gmail.com

## Frecuencia moderada de infección por el virus de la hepatitis C en casos de cirrosis y carcinoma hepatocelular en 4 hospitales de Colombia

Wilson-Alfredo Ríos Ocampo<sup>1</sup>, Germán Osorio Sandoval<sup>1,2</sup>, Beatriz Vieco<sup>2</sup>, Gonzalo Correa<sup>1,3</sup>, Juan Carlos Restrepo<sup>1,3</sup>, Sergio Hoyos<sup>1,3</sup>, Rocío Lopez<sup>4</sup>, Luis Eduardo Bravo<sup>5</sup>, María-Cristina Navas<sup>1</sup>.

### INTRODUCCIÓN

Los principales factores de riesgo asociados con el desarrollo de carcinoma Hepatocelular (HCC), el tipo de cáncer primario de hígado más común, son la infección crónica por el Virus de la Hepatitis C (HCV) y/o Virus de la Hepatitis B (HBV), la exposición dietaria a aflatoxinas y el consumo de alcohol. La mayor incidencia se presenta en países de África sub-sahariana y del este de Asia, donde la infección por HBV es el principal factor de riesgo. En países occidentales la infección crónica por HCV esta emergiendo como la causa mas común de HCC. En Colombia se desconoce el patrón epidemiológico del HCC.

### OBJETIVO

Establecer la frecuencia del biomarcador de infección por HCV por inmunohistoquímica (IHQ) en casos de HCC registrados en el periodo 2000-2004 en los departamentos de patología de la Universidad de Antioquia (UdeA), Hospital Pablo Tobón Uribe (HPTU), Fundación Santa Fe de Bogotá (FSB) y Hospital Universitario del Valle (HUV) y entre el 2005-2007 en casos de cirrosis y HCC en el HPTU.

### METODOLOGÍA

En una primera fase del estudio se utilizó el anticuerpo monoclonal humano no comercial anti-Core B12.F8 y un anticuerpo secundario anti-humano biotinilado; la detección se realizo por la técnica ABC (Avidina Biotina-Complejo peroxidasa). En la segunda fase del estudio se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial anti-Core HCV aa70-90 (MILLIPORE) y el kit de detección HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Lab Vision Corporation). Los controles consistieron en muestras de tejido hepático embebido en parafina

provenientes de casos con diagnostico de infección crónica por HCV, HBV y hepatoblastoma.

### RESULTADOS

De los 46 casos procesados, 8 correspondían a pacientes extranjeros con HCC y 38 a pacientes colombianos, 26 con diagnostico de HCC y 12 con cirrosis. Durante la primera fase del estudio con el anticuerpo B12.F8 se obtuvo un alto marcaje inespecifico producto del anticuerpo secundario. Con el anticuerpo comercial durante la segunda fase los resultados de estandarización fueron satisfactorios. En los casos analizados de pacientes colombianos, la proteína Core fue detectada en 2/12 casos de cirrosis (16,67%) y en 10/26 casos de HCC (38,46 %). La marcación fue citoplasmática con niveles variables de intensidad y un porcentaje de células infectadas entre el 10 y 40% en tejido tumoral y no tumoral. Los casos de infección detectados por IHQ coincidió en 5/10 casos de HCC con serología positiva anti-HCV según las historias clínicas, en el resto de los casos la información no estaba disponible. Conclusiones: Se ha estimado que el 25% de los casos de HCC en el mundo son atribuibles al HCV. Este estudio se considera un primer acercamiento que revela una frecuencia moderada de infección por HCV (12/38 (31,6%)) en los casos analizados en Colombia. Estudios realizados en México, Puerto Rico, Brasil y Perú han reportado una prevalencia del 60%, 33%, 26,9% y 0,73%, respectivamente, según el marcador anti-HCV en casos de HCC. Proyecto financiado por Colciencias (1115 041 6445) y la Universidad de Antioquia.

1. Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia.

2. Departamento de Patología, Universidad de Antioquia.

3. Hospital Pablo Tobón Uribe.

4. Fundación Santa Fe de Bogotá.

5. Hospital Universitario de Valle.

Correspondencia: Maria Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Carrera 53 # 61-30 Torre 2, Laboratorio 434, SIU, Universidad de Antioquia.

E-mail: mcnavasn@gmail.com

## Primer reporte de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH 2) en la región Caribe de Colombia

Felipe García Vallejo<sup>1</sup>, Milton Quintana<sup>2</sup>, Vanessa Otero<sup>2</sup>, Diane M. Diaz<sup>1y</sup> Martha C. Domínguez<sup>1</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia la epidemiología molecular de la infección por el VIH ha sido muy poco estudiada. En este sentido algunos trabajos anteriores reportan la circulación de variantes del subtipo B en la región de los Andes y en Antioquia. Aunque el subtipo B es el principal causante del SIDA/VIH, recientemente se han reportado casos esporádicos de infección por virus de los subtipos C y F. Estos resultados hacen que el panorama de epidemiología molecular de la infección por el VIH-1 comienza a volverse más complejo. Sin embargo a pesar de estos estudios, no existían reportes oficiales de la infección por VIH-2 en nuestro País.

## OBJETIVO

Determinar si el VIH-2 circula en la región del Caribe colombiano.

## METODOLOGÍA

En este estudio se incluyeron 100 muestras de plasma de pacientes con SIDA/VIH provenientes de diferentes localidades de la región Caribe colombiana las cuales fueron reconfirmados mediante un estuche de Western Blot aprobado por la FDA de los Estados Unidos para discriminación de VIH1 y 2. A todos se les midió la carga viral para su posterior genotipificación. Secuenció una región de 1302 bp que incluye porciones de la Transcriptasa Reversa y la Proteasa. Las secuencias obtenidas fueron comparadas filogenéticamente con otras previamente reportadas y consignadas en el GenBank.

## RESULTADOS

De este tamizado, por western blot, se identificaron tres aislados virales caracterizados como VIH-2. Un análisis de secuencias de nucleótidos de un fragmento de 1302 pb del gen Pol y posterior genotipificación, mostró que dos de ellos fueron del subtipo A y el otro una mezcla de subtipos A/B. Análisis filogenéticos realizados mediante el método NJ, agruparon a los dos subtipos A colombianos con una secuencia tipo “outgroup” (HIV-2-31325; subtipo A).

## CONCLUSIÓN

Este es el primer reporte confirmado de la circulación en la región del Caribe colombiano del VIH-2 y el único reportado oficialmente en Colombia. Este

hallazgo pone de relieve la importancia de realizar un estudio de epidemiología molecular más detallado para determinar la dinámica poblacional de la infección por el VIH-2 en nuestro País. Este trabajo fue cofinanciado por COLCIENCIAS, (proyecto No 12830416511), la Universidad del Sinú y la Universidad del Valle con el apoyo logístico de FUNVIHDA.

(1). Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. E-mail: labiomol@gmail.com.

(2). Grupo de Investigación Biomédica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad del Sinú. Montería.

Correspondencia: Felipe García Vallejo. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede San Fernando. Cali. Colombia. E-mail: labiomol@gmail.com

## Genotipos del virus de la hepatitis B en población donante de sangre en Medellín

Julio C Rendon<sup>1</sup>, Fabián M Cortes<sup>1</sup>, Lucelly Rios<sup>2</sup>, Gloria Barco<sup>3</sup>, Juan C Olarte<sup>4</sup>, Sergio Galindo<sup>5</sup>, Maria-Cristina Navas<sup>1\*</sup>

## INTRODUCCIÓN

En América se estiman alrededor de 13 millones de portadores del virus de la hepatitis B (VHB), de los cuales 1.2 millones habitan en Norteamérica y 11.8 millones en Latinoamérica. Ocho genotipos han sido caracterizados para VHB (A-H), con 8% de divergencia. Los genotipos F y H son los más divergentes y se consideran autóctonos de América. Desde 2006 cuatro subgenotipos del genotipo F han sido caracterizados, cada uno con una distribución específica en centro y Suramérica. Colombia presenta regiones de alta, media y baja endemicidad para la infección por VHB, donde las comunidades amerindias son la población de mayor riesgo. Un reciente estudio llevado a cabo con muestras de donantes de sangre, en dos ciudades colombianas Bogotá y Bucaramanga reveló la presencia de los genotipos F, A, D, C y G en población donante siendo el genotipo F el más prevalente (86% de los casos) y específicamente el subgenotipo F3 (82%).

## OBJETIVO

Se pretendió determinar los genotipos de VHB aislados de población donante de sangre en la ciudad de Medellín.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La población de estudio fueron 58 donantes de sangre con marcadores serológicos positivos de infección por VHB (HBsAg y/o anti- HBc) atendidos durante el 2007 en los bancos de sangre del Hospital Pablo Tobón Uribe, la Clínica León XIII, la Cruz Roja Colombiana Seccional Antioquia y el Laboratorio de Salud Pública de Antioquia. Después de la extracción del DNA viral (Trizol®), una región del gen S fue amplificada por PCR heminested usando los primers específicos S1R, YS1 y YS2 previamente publicados por Zeng GB et al. Para la identificación de los genotipos virales fue usada la técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphisms) utilizando las enzimas de restricción BsrI, StyI, CfrI, HpaII y AlwI. Adicionalmente, un total de 218 secuencias del gen S y/o el genoma completo de VHB, disponibles en GenBank, fueron analizadas para los sitios de restricción de la región comprendida entre los nucleótidos 203 y 767 usando Bioedit 7.0.9.0 (Ibis biosciences, Canada).

## RESULTADOS

Durante la amplificación del gen S de VHB se obtuvo resultado positivo en 10/58 muestras (17.2%). Los análisis por RFLP arrojaron patrones de corte en 7/10 muestras; sin embargo, ningún patrón fue concordante con los publicados previamente. Luego de los análisis computacionales, 5/7 patrones obtenidos se ajustaron totalmente con la predicción según Bioedit para el genotipo F, subgenotipo F3. En 5 de las muestras amplificadas, no se logró la genotipificación por ausencia de cortes con las enzimas de restricción (3) o porque presentaron un patrón indeterminado (2).

## CONCLUSIÓN

El F fue el único genotipo encontrado en nuestras muestras, dos de las cuales fueron confirmadas por secuenciación, lo cual concuerda con los datos publicados previamente. Los patrones obtenidos para el genotipo F, son totalmente concordantes con el patrón predicho para el subgenotipo F3 obtenido usando análisis computacional. Los análisis de restricción nos permite proponer un nuevo patrón de restricción específico para el subgenotipo F3; sin embargo estudios adicionales de secuenciamiento y análisis filogenético deben ser implementados para validar estos resultados.

## AGRADECIMIENTOS

**Fuente de Financiamiento:** Sostenibilidad, CODI, Universidad de Antioquia

1Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia,  
2Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia,  
3Hospital Pablo Tobón Uribe,  
4Cruz Roja Colombiana Seccional Antioquia, 5Clínica León XIII.

Correspondencia: María Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Carrera 53 # 61-30 Torre 2, Laboratorio 434, SIU, Universidad de Antioquia.

E-mail: mcnavasn@gmail.com

## Diseño, implementación y evaluación de una estrategia de intervención en dengue con enfoque de ECOSALUD en un área demostrativa de la zona urbana de Cali

Fabián Méndez Paz<sup>1</sup>, Miguel Peña<sup>2</sup>, Beatriz Parra<sup>3</sup>, Janeth Mosquera<sup>4</sup>, María Cristina Maldonado<sup>5</sup>, Carlos Andrés Morales<sup>6</sup>, Ranulfo González<sup>7</sup>, Yoseth Ariza<sup>8</sup>, Genny Martínez<sup>9</sup>, Patricia García<sup>10</sup>, Diana Lucumí<sup>11</sup>.

## OBJETIVOS

*General:* Identificar e intervenir los principales factores ambientales, socioeconómicos y políticos que interactúan en la transmisión del dengue en un área demostrativa en la ciudad de Cali. *Específicos:* 1) Identificar las percepciones, conocimientos y prácticas individuales, colectivas e interinstitucionales relacionadas con la transmisión y control del dengue. 2) Caracterizar los principales factores (entomológicos, virológicos, climáticos, del crecimiento urbano y los conocimientos de la población) que influyen en la transmisión del dengue en la zona. 3) Diseñar, implementar y evaluar una intervención que complemente la EGI para el control del dengue en un área demostrativa en la comuna 6 de Cali.

## METODOLOGÍA

El enfoque en el que se inscribe esta propuesta es el de ECOSALUD, está basado en los principios de transdisciplinariedad, participación comunitaria y equidad. El área demostrativa seleccionada para el proyecto está ubicada en la comuna 6. *Objetivo 1:* revisión documental, entrevistas a profundidad y grupos focales realizados a personas de la comunidad y de las

instituciones. *Objetivo 2:* para la recolección y análisis de información de condiciones de saneamiento ambiental, información entomológica, climática, clínica y social se desarrollaron los siguientes procesos: recolección de información de fuentes secundarias, una “inspección sanitaria” para identificar los factores de riesgo, sanitarios y ambientales. Actualmente se desarrollan: una encuesta poblacional que incluye componentes clínicos, sanitarios y sociales, una encuesta de conocimientos y prácticas de diagnóstico en los equipos de salud, una encuesta entomológica de formas inmaduras y un muestreo entomológico ligado a una seroprevalencia de infección en humanos. *Objetivo 3:* Se seguirán las bases de la planeación participativa de la intervención en salud pública, en este caso el modelo para el diseño de la intervención será el MAPP (Mobilizing for Action through Planning and Partnerships), cuyo fin es mejorar la salud y la calidad de vida a través de la movilización comunitaria e intersectorial y la ejecución y evaluación de estrategias de acción

## RESULTADOS

Por métodos de investigación cualitativa se lograron identificar las representaciones individuales, sociales e institucionales en cuanto a las causas y factores de transmisión de la enfermedad, las formas de control y la responsabilidad de cada uno de los actores en las estrategias de control. De otra parte, y como resultado de una Inspección Sanitaria se obtuvo una descripción de las principales características ambientales del peridomicilio en el área. La revisión de fuentes secundarias permitió realizar el análisis de la ocurrencia de dengue en la ciudad y su relación con variables climáticas para el periodo 2001-2007. Como resultado de la discusión transdisciplinar se ha construido un modelo conceptual que incluye factores que se interrelacionan en tramas complejas de causalidad en la dinámica de transmisión del dengue: del ambiente biofísico (crecimiento urbano desordenado y variación climática), del componente sociocultural (prácticas inadecuadas y baja participación comunitaria e intersectorial) y del ámbito económico y político (las reformas a la salud y a los regímenes de contratación laboral).

## CONCLUSIONES

Al final del proyecto se espera: 1. Contribuir al control del dengue mediante el diseño de estrategias que incorporen el enfoque de **ECOSALUD**. 2. Brindar evidencias de la aplicación del enfoque de **ECOSALUD** como alternativa para investigar la complejidad del dengue y de otros problemas en salud ambiental y desarrollar intervenciones integrales.

## AGRADECIMIENTOS

**Financiación:** International Development Research Centre (IDRC), Universidad del Valle, Secretaría de Salud Pública Municipal

1 MD, PhD. Profesor Escuela de Salud Pública Universidad del Valle. Coordinador Grupo Epidemiología y Salud Poblacional (GESP)

2 Ing. PhD Profesor Facultad de Ingenierías Universidad del Valle. Coordinador Grupo de Investigación en Saneamiento Ambiental (GISAM)

3 MSc, PhD Profesora Escuela de Ciencias Básicas Universidad del Valle. Coordinadora Grupo de Virus Emergentes y Enfermedad (VIREM)

4 Trab. Soc. Mag. Profesora Escuela de Salud Pública Universidad del Valle. Investigadora asociada Grupo Epidemiología y Salud Poblacional (GESP)

5 Trab. Soc. Mag. Investigadora asociada Grupo Epidemiología y Salud Poblacional (GESP)

6 Biólogo. Entomólogo Programa de control de dengue. Secretaría de Salud Pública Municipal de Santiago de Cali

7 Biólogo. Entomólogo Profesor Facultad de ciencias Universidad del Valle. Coordinador Grupo de Entomología

8 MD, Cand Mag Asistente de investigación Grupo Epidemiología y Salud Poblacional (GESP)

9 Ing San Asistente de investigación Grupo Epidemiología y Salud Poblacional (GESP) Grupo de Investigación en Saneamiento Ambiental (GISAM)

10 Trab Soc Asistente de investigación Grupo Epidemiología y Salud Poblacional (GESP)

11 Est Biología Asistente de investigación Grupo de Entomología

Correspondencia: Grupo de investigación GESP. CALLE 4B # 36-00, Universidad del Valle. Sede San Fernando. Cali, Valle del Cauca. E-mail: famendez@univalle.edu.co

## Frecuencia de infección por el virus de la hepatitis B en casos de cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular

Iris Suarez<sup>1</sup>, Germán Osorio<sup>1,2</sup>, Beatriz Vieco<sup>2</sup>, Juan Carlos Restrepo<sup>1,3</sup>, Sergio Hoyos<sup>1,3</sup>, Gonzalo Correa<sup>1,3</sup>, Luis Eduardo Bravo<sup>4</sup>, Rocío López<sup>5</sup>, María-Cristina Navas<sup>1\*</sup>

## INTRODUCCIÓN

Se estima que más de 2 billones de individuos han sido infectados por el virus de la hepatitis B (HBV); de estos entre 350 y 400 millones presentan infección persistente y están en riesgo de sufrir enfermedad hepática progresiva como cirrosis, falla hepática y carcinoma hepatocelular.

A nivel global, aproximadamente un tercio de los casos de cirrosis hepática, y la mitad de los casos de carcinoma hepatocelular (HCC) pueden atribuirse a la infección crónica por HBV. En Latinoamérica, aproximadamente el 43% de los casos de HCC son atribuibles a HBV (Perz, et al., 2006).

## OBJETIVO

Describir la frecuencia de infección por HBV en casos de HCC registrados en el período 2000-2004 en cuatro hospitales de las ciudades de Bogotá, Medellín y Cali, y en casos de HCC y cirrosis hepática registrados en el periodo 2005-2007 en un hospital en Medellín.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la detección de las proteínas HBcAg (antígeno Core) y HBx (proteína X) del HBV por inmunohistoquímica a partir de tejido hepático embebido en parafina, utilizando anticuerpos monoclonales comerciales y el kit Ultravision LP detection system HRP Polymer & DAB Plus Chromogen (Lab Vision corporation).

## RESULTADOS

Un total de 55 casos fueron incluidos en los ensayos de inmunohistoquímica para la detección de la proteína Core del HBV (12 casos de Cirrosis y 43 casos de HCC) y 46 en los ensayos de detección de la proteína HBx (11 casos de cirrosis y 35 casos de HCC); De este análisis se excluyeron 8 casos de HCC que corresponden a pacientes extranjeros. De los casos de pacientes Colombianos, la proteína Core fue detectada en una sola muestra con diagnóstico de cirrosis (1/12), en ninguna de los 35 casos de HCC HbcAg fue evidenciada. La presencia de HBx fue demostrada en 3 de los 11 casos de cirrosis hepática analizado (27,3%) y en 12 de 27 casos de HCC (44,4%).

## CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que la infección por HBV posiblemente corresponde a uno de los principales factores de riesgo asociado a HCC en la población de estudio; estos hallazgos coinciden con los resultados esperados considerando el perfil epidemiológico de la infección por HBV en Colombia; sin embargo, no son extrapolables a otras poblaciones considerando la heterogeneidad de la endemia de la infección por HBV. Son necesarios estudios complementarios en los que se evalúen otros marcadores de infección como la amplificación del genoma viral y la detección de la

proteína HBx por otras técnicas como western blott. En relación a la cirrosis hepática la frecuencia infección por este virus corresponde al perfil epidemiológico descrito a nivel mundial. Es el primer estudio realizado en Colombia tendiente a describir la frecuencia de infección por HBV como factor de riesgo en pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática y HCC.

## AGRADECIMIENTOS

**Fuente de Financiamiento:** Colciencias (1115 041 6445) y la Universidad de Antioquia

1. Grupo de Gastrohepatología, Universidad de Antioquia
2. Departamento de Patología, Universidad de Antioquia
3. Hospital Pablo Tobón Uribe
4. Universidad del Valle
5. Fundación Santa Fé de Bogotá

Correspondencia: María Cristina Navas, Grupo de Gastrohepatología, Carrera 53 # 61-30 Torre 2, Laboratorio 434, SIU, Universidad de Antioquia.

E-mail: mcnavasn@gmail.com

## Evaluación de la competencia vectorial de *Aedes aegypti* a DENV-2 provenientes de aislados clínicos (1995-2007)

Carolina Quintero G<sup>1</sup>, Marlén Martínez-Gutiérrez<sup>1</sup>MSc, Francisco Díaz<sup>3</sup>, Marta Ospina<sup>4</sup>, Oladier Hoyos<sup>1</sup>, Andrés Uribe<sup>1</sup>, Jorge Emilio Osorio<sup>1-2</sup>, Iván Darío Vélez<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

En gran parte del territorio Colombiano, co-circulan los cuatro serotipos de Virus Dengue (DENV-1 a DENV-4) durante todo el año, ocasionando un aumento en el número de casos de Fiebre por Dengue (DF) y Dengue hemorrágico (DHF). Sumado a esto, las poblaciones del vector *Aedes aegypti* han aumentado considerablemente principalmente por factores socio-ambientales; poniendo en mayor riesgo de infección a la población. La transmisión del DENV depende en gran medida de la Competencia vectorial, definida como la habilidad del mosquito de infectarse, y posteriormente infectar un nuevo huésped susceptible. Esta competencia se puede ver afectada por cambios genotípicos/fenotípicos en el virus que son comunes debido a la alta tasa de mutación de éste. Estudios filogenéticos recientes indican que ha ocurrido una variación para DENV-2 durante la última

década; estos cambios, podrían resultar en cambios fenotípicos y con esto el aumento del potencial epidémico.

## OBJETIVO

Evaluar la Competencia Vectorial en colecciones de *A. aegypti* a DENV-2, aislados en Medellín durante 1995 y 2007.

## METODOLOGIA

Se amplificaron la cepa de referencia S16803 y los aislados 496/1995 y 3986/2007 de DENV-2 en cultivo de células de insecto; tras 9 días de infección se colectaron sobrenadantes que fueron cuantificados por ensayo de placas y por qRT-PCR. Mosquitos del género *A. aegypti* (Rockefeller) fueron retados vía oral con sangre humana mezclada con concentraciones conocidas de DENV-2. Los controles negativos fueron alimentados sólo con sangre. 5, 8, 12 y 14 días post-alimentación, se disecaron intestinos medios y cabezas para evaluar por inmunofluorescencia la cantidad de antígeno viral. Adicionalmente, de las cabezas se extrajo RNA viral con el fin de cuantificar genomas virales por qRT-PCR.

## RESULTADOS PRELIMINARES

Por inmunofluorescencia, se detectaron diferencias en los niveles de antígeno viral en los estómagos de mosquitos alimentados con virus provenientes de aislados clínicos, con respecto a la cepa de referencia en días tardíos de la infección. Del mismo modo, la cantidad de genoma viral, es mayor en los mosquitos alimentados con los aislados, diferencia que se hace considerable principalmente a los 15dpi

## CONCLUSION

Existen diferencias en cuanto a los niveles de infección en *A. aegypti* con los aislados en relación a la cepa de referencia, mostrando una mejor eficiencia de infección que se ve reflejada en un mayor número de copias genómicas detectadas en las cabezas de mosquitos alimentados con virus provenientes de aislados clínicos.

<sup>1</sup>Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET- Universidad de Antioquia

<sup>2</sup>Universidad de Wisconsin

<sup>3</sup>Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia

<sup>4</sup>Laboratorio Departamental de Salud de Antioquia

Correspondencia: Carrera 53 # 61-30. Sede de Investigación Universitaria - SIU. Torre 2. Laboratorio 632

E-Mail: dcara63@gmail.com

## Inducción del inmunoregulador ST2 en células endoteliales por suero de pacientes con dengue esta relacionado con el TNF-alfa

Natalia Houghton-Triviño<sup>1</sup>, Doris Salgado<sup>2</sup>, Jairo Rodríguez<sup>2</sup>, Irene Bosch<sup>3</sup>, Jaime E.Castellanos<sup>1,4</sup>

## INTRODUCCIÓN

El inmunoregulador ST2 soluble es expresado en el endotelio en respuesta a estímulos inflamatorios como mecanismo de control e incluso durante la infección por dengue. Las células que expresan ST2, su regulación y función en el dengue no se conocen.

## OBJETIVO

En este trabajo, se estudiaron los patrones de expresión de dos isoformas de este gen (receptor soluble y anclado a membrana ST2s y ST2L respectivamente) en un grupo de 38 pacientes con Fiebre de dengue (FD) y Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y la regulación de su expresión en células endoteliales humanas (HUVEC).

## MATERIALES Y MÉTODOS

La expresión de las isoformas soluble y anclada a membrana (ST2s y ST2L, respectivamente) fue cuantificada por PCR en tiempo real y ELISA en HUVEC estimuladas con suero de pacientes en presencia de un anticuerpo neutralizante de TNF-alfa. El TNF-alfa circulante fue cuantificado en los sueros.

## RESULTADOS

Se encontraron altos niveles séricos de ST2s en pacientes con FHD comparado con pacientes con FD y voluntarios sanos ( $3,9 \pm 2,4$  ng/ml vs.  $1,5 \pm 1,2$  ng/ml vs.  $0,53 \pm 0,5$  ng/ml ;  $r^2=0,29$   $p = 0,001$ ); así como una correlación significativa entre los niveles de citoquinas pro-inflamatorias TNF-alfa e IL-8 y los pacientes con FHD ( $r^2=0,33$   $p = 0,003$ ). Por el contrario, los

pacientes con FD presentaron niveles mayores de la citoquina reguladora IL-10 ( $r^2=0,22$   $p = 0,001$ ). No se encontró correlación entre la carga viral y la severidad de la enfermedad ( $r^2=0,09$   $p = 0,6$ ). Como marcador de activación, se cuantificó ICAM en células HUVEC estimuladas con sueros de los pacientes. El suero de pacientes FDH produjo un aumento significativo en la expresión de ICAM comparado con las células estimuladas con sueros de pacientes FD o voluntarios (66 vs. 32 vs. 38  $p<0,05$ , Arbitrary Units). Usando real time PCR, no se encontraron cambios en la expresión de ST2s en PBMC de los pacientes (FD y FHD), sin embargo se produjo un aumento de 10 veces en el mRNA para ST2s en las HUVEC estimuladas con sueros FHD ( $p<0,01$ ) y un incremento significativo en los niveles de la proteína ST2s con respecto al estímulo con sueros FD o voluntarios ( $2,4\pm 0,06$  pg/ml vs.  $1,8\pm 0,1$  ng/ml vs.  $1,4\pm 0,2$  ng/ml respectivamente,  $p<0,01$ ). La neutralización del TNF-alfa. en los sueros de los pacientes disminuyó en más del 50% la secreción de ST2s y la expresión de ICAM en las células HUVEC. Interesantemente, el tratamiento con los sueros de los pacientes con FD y FHD indujeron una desregulación en la expresión de ST2L en las HUVEC. Este efecto fue mayor cuando el TNF-alfa. fue bloqueado. Estos datos nos indican diferencias en la regulación de la expresión de las dos isoformas de ST2.

## CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que el TNF-alfa puede regular la expresión de ST2s en el endotelio vascular durante la enfermedad del dengue, ayudando a regular negativamente la respuesta inflamatoria en los pacientes FHD y favoreciendo el switch de citoquinas Th1 a Th2 durante la convalecencia.

- 1.- Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá Colombia.
- 2.- Grupo Parasitología y Medicina Tropical, U. Surcolombiana, Neiva Colombia
- 3.- School of Medicine, U. of Massachusetts, Boston, USA.
- 4.- Grupo Patogénesis Viral, Facultad de Odontología, U. Nacional de Colombia, Bogotá

Correspondencia: Grupo de Virología, Universidad El Bosque, Carrera 7B Bis N° 132-11, Edificio de Rectoría, Laboratorio 205. Tel. 6489066.

E-mail: castellanosjaime@unbosque.edu.co

## Determinación de la presencia y nivel de expresión de $\beta$ -Defensinas humanas 1 y 3 en placenta de mujeres VIH-1 positivas y negativas

Wbeimar Aguilar Jiménez<sup>1</sup>, Wildeman Zapata Builes<sup>1</sup>, Maria Teresa Rugeles López<sup>1</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La epidemia del VIH-1 ha hecho evidente la existencia de mecanismos de resistencia natural en individuos expuestos al virus pero que permanecen sin evidencia clínica ni serológica de infección, quienes se conocen como expuestos seronegativos (ESN); en este grupo se incluyen los neonatos nacidos de madres seropositivas (SP), en los cuales se ha observado una baja tasa de infección aún en ausencia de medidas preventivas, lo que resalta la existencia de mecanismos de resistencia en la interfase materno-fetal. Estos mecanismos no han sido descritos en su totalidad y representan un blanco importante de investigación. Las beta defensinas humanas (HBD), son péptidos catiónicos y antimicrobianos que se producen primordialmente en las mucosas, principal puerto de entrada del VIH-1 al organismo. Recientemente se demostró que HBD-2 y 3 son inducidas por el VIH-1 en células del epitelio oral humano y que estos péptidos tienen la capacidad de inhibir la replicación del VIH-1 in Vitro. Estas evidencias sugieren que las HBD participan en la protección de la mucosa oral y posiblemente de otras superficies mucosas durante la exposición al VIH-1.

## OBJETIVO

Determinar la presencia y el nivel de expresión de mRNA de HBD-1 y 3 en muestras de placenta de madres VIH-1 positivas y madres controles sanos (CS) para dilucidar si como consecuencia de la exposición viral y posiblemente como un mecanismo de protección del bebé se puede evidenciar diferencias en la expresión de HBD en estos grupos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de placenta, de 36 madres VIH-1 positivas y 38 madres CS, se extrajo el RNA total y

se cuantificaron las unidades relativas de transcritos de HBD-1 y 3 mediante RT-PCR en tiempo real. Para excluir la participación de otro mecanismo asociado a la resistencia natural en los hijos nacidos de las madres SP, se detectó la mutación .32 en el gen CCR5 por PCR.

## RESULTADOS

Ningún bebé fue infectado por el VIH-1. No se observaron individuos homocigotos para la mutación .32. Las madres seropositivas expresaron niveles significativamente mayores de mRNA de HBD-1 en placenta que las madres CS. Adicionalmente, las unidades relativas de transcritos de mRNA de HBD-3 en placenta fueron significativamente más altas en madres CS que en las madres SP.

## CONCLUSIONES

La mutación .32 no es responsable por la resistencia al VIH-1, exhibida por este grupo de bebés ESN. La mayor expresión de mRNA de HBD-1 en placenta de madres seropositivas puede ser el resultado del estímulo viral o estar asociado al fenómeno de resistencia natural observado en los neonatos de madres SP. Además, la HBD-3 podría estar siendo regulada negativamente en placenta de mujeres SP a consecuencia de la infección viral mediante mecanismos no establecidos aún.

1. Grupo de Inmunovirología. Universidad de Antioquia (e-mail: Wbeimar.aguilar@siu.udea.edu.co)  
Correspondencia: Grupo Inmunovirología. Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia. Calle 62 # 52-59. Laboratorio 532 Medellín-Colombia.  
E-mail: wbeimar.aguilar@siu.udea.edu.co

## **La expresión de TLR2 y TLR4 en pacientes infectados por el VIH-1 es modulada por infecciones oportunistas**

Juan C. Hernández<sup>1</sup>, Georges Laurent<sup>2</sup>, Ajit Kumar<sup>2</sup>, Danielle Hernandez-Verdun<sup>3</sup>, Silvio Urcuqui-Inchima<sup>1</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La capacidad de activar una respuesta inmune contra los copatógenos asociados a la infección por el VIH-1, depende de las moléculas del sistema de reconocimiento innato,

tales como los receptores tipo Toll (TLR, del inglés Toll-like receptors). Los TLR activan la inmunidad innata y modulan el desarrollo de la inmunidad adaptativa, para el control de los agentes infecciosos. En la infección por el VIH-1, los TLR pueden por un lado promover una respuesta antiviral en los estadios tempranos, activando las vías de señalización que conllevan a la expresión de interferón, o en la transcripción del genoma viral. Sin embargo, no existe evidencias que relacionen al VIH-1 con la modulación de la expresión de los TLR, como un mecanismo de la evasión de la respuesta inmune y/o para promover su replicación; igualmente se desconoce el papel que cumplen los microorganismos oportunistas en este escenario.

## OBJETIVO

El propósito del presente trabajo fue evaluar la expresión de TLR2 y TLR4 en tres subpoblaciones celulares de sangre periférica, obtenidas de individuos infectados con VIH-1, clasificados según la carga viral, el uso de HAART y la presencia de infecciones oportunistas, y en controles sanos negativos para la infección por VIH-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La expresión de TLR2 y TLR4 fue cuantificada por citometría de flujo en monocitos (CD14+); células dendríticas mieloides [mDC (CD11calto Lin1-)] y plasmacitoides [pDC (BDCA-2+ CD123alto)]. Para los análisis estadísticos se utilizaron las pruebas de t student y ANOVA, para comparar la expresión de los TLR entre los diferentes grupos, considerando significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se encontró un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en mDC, y de TLR4 en pDC, obtenidas de pacientes infectados con VIH-1 con infecciones oportunistas, especialmente en aquellos pacientes que no han iniciado tratamiento antirretroviral, comparados tanto con pacientes infectados con VIH-1 sin infecciones oportunistas, como con los controles sanos. El aumento de la expresión de los dos TLR fue mayor en los pacientes co-infectados con M. tuberculosis o agentes micóticos como *Candida* spp. Igualmente se observó una correlación positiva entre la expresión de TLR2 (determinada como intensidad media de fluorescencia) y la carga viral en monocitos de los pacientes infectados con VIH-1 y con infecciones oportunistas, pero no entre la expresión de los TLR y el recuento de los linfocitos T CD4+, en sangre periférica.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Estos hallazgos sugieren que la expresión en células presentadoras de antígenos, como monocitos y DC de sangre periférica, de los dos TLR evaluados, podría ser modulada positivamente en individuos infectados con VIH-1 y con infecciones oportunistas. En este caso, la inmunosupresión causada por el VIH-1 favorece la infección por microorganismos oportunistas, los cuales podrían estimular los TLR, activando así NF- $\kappa$ B, el cual participa activamente en la transcripción del genoma viral. Nuestros resultados podrían estar explicando uno de los posibles mecanismos, mediante el cual las infecciones oportunistas aceleran la progresión a sida, en los pacientes co-infectados.

1. Grupo Inmunovirología - Universidad de Antioquia, Colombia.
2. Biochemistry, Molecular Biology and Genetics – Georges Washington University, USA.
3. Uclei and Cell Cycle - Institut Jacques Monod, Francia.

Correspondencia: Juan Hernandez, Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.

E-mail: juankhernandez@gmail.com

## **Amplificación de la glicoproteína E2 del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) a partir de una cepa colombiana (ICA) Para ser empleada como transgen en un vector adenoviral**

Diana Susana Vargas<sup>1,3</sup>, Víctor Julio Vera Alfonso<sup>2,3</sup>, Jairo Jaime Correa<sup>2,3</sup>

### INTRODUCCIÓN

El VDVB es uno de los agentes infecciosos más importantes del ganado bovino con una alta prevalencia a nivel mundial. Desde los años noventa, se ha empezado a desarrollar experimentalmente vacunas recombinantes para el control de esta enfermedad. Estas vacunas permiten trabajar únicamente con las proteínas inmunogénicas del virus evitando la exposición al virus completo; disminuyendo la probabilidad de reversión viral. Así mismo, se fundamentan en la búsqueda de un sistema eficiente para la expresión y presentación de antígenos que generen una potente inmunidad humoral y celular. Esto se logra mediante el empleo de proteínas virales altamente inmunogénicas como la E2, la cual contiene los epítopes

que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes posteriores a la infección y a la vacunación. Los genes que codifican para estas proteínas son introducidos dentro de un vector que permita su expresión de forma completa, troncada o quimérica de la E2.

### OBJETIVO

Amplificar la glicoproteína E2 del BVDV en forma completa y troncada a partir de una cepa colombiana para su posterior inserción en un vector viral.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajaron las cepas virales ICA (cepa colombiana obtenida previamente de un brote natural de la enfermedad de las mucosas en la Sabana de Bogotá en 1984, suministrada por el Instituto Colombiano Agropecuario) y la cepa de referencia Singer del BVDV. Para la amplificación de la E2, inicialmente se amplificó la región del genoma 5' UTR del BVDV, la cual es una región conservada entre los diferentes pestivirus con el fin de determinar que las cepas trabajadas correspondían al virus. Posteriormente, se amplificó el gen viral E2 en una versión completa y una troncada mediante RT-PCR empleando primers específicos a los cuales se les adicionó sitios de restricción para facilitar su posterior inserción en un sitio específico del vector adenoviral.

### RESULTADOS

La amplificación de la E2 es el paso inicial en la construcción de un vector adenoviral para el BVDV. Se observaron diferencias en la amplificación de la versión troncada y completa de la proteína E2 en las cepas virales utilizadas. La cepa colombiana ICA amplificó las dos versiones de la proteína, a diferencia de la cepa de referencia que solo amplificó la E2 troncada. Estas dos versiones de la cepa colombiana se insertaron en la construcción del vector para evaluar su posterior expresión en cultivos celulares complementarios. El trabajo con vacunas recombinantes permite utilizar solo una fracción del virus, en este caso se empleó la proteína más inmunogénica del BVDV. A pesar de que el gen que codifica la proteína E2 es la más inmunodominante también es la más hipervariable, por tal motivo se observaron diferencias de amplificación entre las cepas utilizadas.

### CONCLUSIONES

La amplificación de las dos versiones de la proteína en la cepa viral colombiana permite generar biológicos mediante las técnicas recombinantes para proteger los

animales con las cepas actuantes en el medio. Así mismo, se quiere ampliar el conocimiento en la metodología de la construcción de estas vacunas para posteriores desarrollos empleando virus que tengan incidencia en el sector pecuario.

1. MV, Estudiante de Maestría
  2. MV, Msc, PhD
  3. Laboratorio de Virología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá., e-mail:jjaimec@unal.edu.co
- Correspondencia: Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá. E-mail: jjaimec@unal.edu.co

## **Caracterización de los microambientes cromosómicos adyacentes a los sitios de integración del provirus HTLV-1 en asintomáticos**

Mercedes Salcedo-Cifuentes<sup>1</sup>, Felipe García-Vallejo<sup>2,3</sup>, Adalberto Sánchez<sup>2,4</sup>, Irene Teascher<sup>5</sup>.

### **INTRODUCCIÓN**

Estudios recientes, evidencian que tanto en el HTLV-I como en otros retrovirus humanos y no humanos, no se integran al azar. Este proceso no aleatorio, es dependiente de factores estructurales y funcionales de los microambientes genómicos del ADN huésped.

### **OBJETIVO**

Caracterizar el microambiente genómico de las secuencias adyacentes al provirus HTLV-I.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó el alineamiento de 80 secuencias IPCR procedentes de sujetos portadores de HTLV-I (Query) contra la base de datos Genome Browser de la Universidad del California, considerando ventanas de apertura de 100 a 500 Kb y 1 Mg. Alineamientos con homologías = 95% y scores estadísticamente significativos fueron incluidas en el análisis estadístico, para lo cual se construyó una base de datos en EXCEL

en donde se incluyeron como variables la ubicación cromosómica, el número de genes adyacentes, el proceso biológico en el que interviene y su ubicación subcelular. Adicionalmente se incluyó el número de islas CpG, No de repeticiones discriminadas por tipo secuencia repetitiva: SINEs (Alu y MIR), LINEs (L2 y otros) y repeticiones RNA. El análisis se realizó con el paquete estadístico SPSS 10.

### **RESULTADOS**

Se describen secuencias adyacentes al provirus ricas en repeticiones tipo Alu, Satélite y RNA. Las secuencias homólogas a las secuencias IPCR en estudio se ubican preferentemente en los cromosomas 2,16,18,19, X y Y.

### **CONCLUSIONES**

El perfil cromosómico de las secuencias IPCR procedentes de pacientes asintomáticos es diferente al perfil de secuencias IPCR procedentes de pacientes LLTCA analizadas durante la primera fase del estudio bioinformático. Sin embargo, comparten características en el tipo de secuencia y las que codifican (secuencias génicas) tienen funciones moleculares o intervienen en procesos biológicos semejantes.

1. Profesora escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Candidata a Doctorado en Ciencias Básicas Biomédicas.
  2. Profesores escuela de Ciencias Básicas.
  3. Director de Tesis. Director Científico del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Coinvestigador.
  4. Asesor de Tesis. Coinvestigador.
  5. Profesora Facultad de Ingenierías. Coinvestigadora.
- Correspondencia: Mercedes Salcedo-Cifuentes. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede San Fernando. Cali. E-mail: mercysal2003@yahoo.com

## **Epidemiología molecular en la región caribe de Colombia de la resistencia de variantes del VIH 1 a diferentes drogas antirretrovirales**

Martha C Domínguez<sup>1</sup>, Vanessa Otero<sup>2</sup>, Diane M Diaz<sup>1</sup>, Milton Quintana<sup>2</sup> y Felipe García Vallejo<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

La emergencia de cepas resistentes a antirretrovirales es uno de los problemas más comunes y preocupantes de salud pública mundial, pues, al igual que el amplio rango de drogas antirretrovirales, y el uso prolongado de las mismas, la falta de adherencia y los efectos colaterales, son factores importantes que favorecen la aparición de fallas en la terapia antirretroviral en pacientes con VIH-SIDA. La falla en el tratamiento, que generalmente se da por la selección de variantes mutantes resistentes a drogas antirretrovirales, se puede monitorear mediante la genotipificación. Ésta se lleva a cabo mediante la detección de mutaciones puntuales en la transcripta reversa (TR) y la proteasa (Pr).

## OBJETIVOS

Identificar mutaciones asociadas con resistencia a drogas antirretrovirales en pacientes SIDA/VIH de la costa Caribe de Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODO

Se seleccionó un grupo de 100 pacientes tratados y no tratados, provenientes de distintos municipios de esta región de Colombia. Todos los voluntarios incluidos en el estudio fueron confirmados mediante la prueba Western Blot. A todos ellos se les aplicó una encuesta epidemiológica y se les calculó su carga viral (CV); aquellos pacientes con cargas virales mayores de 2000 copias/ml fueron genotipificados empleando para ello el estuche ViroSeq de ABBOTT.

## RESULTADOS

Se encontró, que para la Transcriptasa Reversa, las mutaciones mas frecuentes y que se asocian con resistencia contra Nucleósidos Inhibidores de Transcriptasa Reversa (NRTI) fueron M184V (37%), L74I y Q151L/M (8.7%) cada una; en menor proporción y confiriendo una posible resistencia la T215F(7.4%), T69I (3.7%) y V75T(3.7%). Otras mutaciones presentes que no confieren resistencia son G333E, G333D/E, A62V, K219E, K219N, V118I, D67G, K70R y K219E. En cuanto a las mutaciones relacionadas con resistencia a No Nucleósidos Inhibidores de Transcriptasa Reversa (NNRTI) se registraron la K103N (37%), Y181C (7.4%), G190A (3.7%), y G190S (3.7%); se presentaron mutaciones menores en los residuos V179D, M230L, P225H, A98G, V108I, K103S, K101E y V179D. Para la Proteasa (PR) se caracterizaron mutaciones asociadas con resistencia en los codones I50V (3.7%) y L90M

(3.7%), se determinó la presencia de mutaciones menos frecuentes como L63P, V77I, M36I, A71T, A71V, M36L, L10I, L70V, I54M, V82A y la I84V. Se destaca la presencia de un paciente multiresistente a las diferentes clases de drogas antirretrovirales; además se caracterizaron dos pacientes con ausencia de mutaciones. De igual forma se encontró un paciente sin antecedentes terapéuticos portador de la mutación V106A, documentada en la literatura como resistente a Nevirapina. La presencia V106A en este paciente sin antecedentes terapéuticos parece evidenciar un caso de transmisión horizontal.

## CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos es posible concluir que el conjunto de mutaciones reportadas en este trabajo constituyen el primer marco de referencia para la región Caribe Colombiana y en alguna medida modifica el mapa epidemiológico en la Costa Caribe y en Colombia.

## AGRADECIMIENTOS

**Fuente de Financiamiento:** COLCIENCIAS, (proyecto No 12830416511), la Universidad del Sinú y la Universidad del Valle con el apoyo logístico de FUNVIHDA.

1. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas.

Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. E-mail:

labiomol@gmail.com.

2. Grupo de Investigación Biomédica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad del Sinú. Montería

Correspondencia: Martha C. Domínguez. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede San Fernando. Cali. E-mail: mcdoming58@hotmail.com

## Posibles estrategias virales para el transporte intracelular del virus dengue

Andrea I. Trujillo-Correa<sup>1</sup>, Juan C. Gallego-Gómez<sup>1,2</sup>

## INTRODUCCIÓN

El Dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial, ya que

produce la fiebre hemorrágica de mayor incidencia. Se han realizado estudios epidemiológicos y moleculares sobre el Virus del Dengue (DENV), sin embargo faltan estudios básicos sobre la interacción virus-célula hospedera, cuyo conocimiento puede ayudarnos a entender procesos básicos de la patogénesis de esta enfermedad. El conocimiento de algunos pasos del ciclo de replicación del virus en la célula huésped y de algunas características estructurales y funcionales de las proteínas virales, ha promovido el estudio de diversos blancos potenciales para la acción antiviral. La mayoría de estudios relacionados con el ciclo infeccioso del DENV se han centrado en entender los mecanismos moleculares de la entrada, la replicación y el ensamblaje. Sin embargo existen pocos estudios que permiten comprender como las partículas virales se mueven dentro de las células para poder llegar a los sitios adecuados donde realizan de una forma eficiente su replicación. Se conoce que moléculas con un tamaño superior a 500 KDa o 50 nm no pueden moverse libremente, es por esta razón que se ha demostrado que algunos virus -desnudos o empaquetados en vesículas- usan el citoesqueleto para moverse intracelularmente. Es probable que la interacción entre el DENV y su receptor de membrana, dispare una serie de eventos dinámicos que, como ocurre con otros virus, generan la reorganización del citoesqueleto lo que permite la entrada de las partículas virales. Adicionalmente, la patogénesis de este virus, se ha relacionado con un incremento en la permeabilidad transendotelial y rompimiento de las uniones intracelulares, debido a la reorganización del citoesqueleto derivando en hemorragia y edema.

## METODOLOGÍA

Para analizar la interacción de proteínas virales con los elementos del citoesqueleto, se trataron células Vero antes y después de la infección, con agentes espolimerizantes de microtúbulos (Nocodazol) y actina (Citocalacina D). Se procesaron las células infectadas, para microscopía avanzada de fluorescencia (IX-81 Olympus) con análisis de imagen (Image Pro Plus de MediaCybernetics), además con los sobrenadantes se cuantificaron viriones infecciosos mediante titulación por ensayo de plaqueo.

## RESULTADO

Se demuestran que posiblemente existe una interacción entre el DENV y los elementos del citoesqueleto, usando microscopía avanzada de fluorescencia se observó colocalización, entre las proteínas virales con actina y microtúbulos, que podría estar implicadas

en algún paso del ciclo replicativo. Además con la despolimerización de elementos del citoesqueleto, cambia el patrón de distribución subcelular de proteínas virales con respecto al control, observándose acumulación principalmente en la región perinuclear y además se observa un marcaje difuso menos intenso que puede corresponder a proteína viral soluble sin ensamblar. Esto concuerda con una disminución de las partículas virales infecciosas observadas por titulación.

## CONCLUSIÓN

estos resultados sugieren que, posiblemente existe una interacción entre el DENV y el citoesqueleto, debido a que las partículas virales pueden usar los filamentos de actina y microtúbulos, para su transporte en los diferentes pasos de su ciclo vital y de esta manera realizar una infección exitosa.

1. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Línea Biología Viral.

2 Grupo de Neurociencias de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria-SIU. Universidad de Antioquia.

Correspondencia: Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, Calle 62 # 52-59. Torre 2 .Piso 6. Lab 632. Tel 574 2196506. Fax: 574 2196511. E-mail: andretru@pecet-colombia.org

## Reconocimiento inmune opuesto de IgG De Suero E Iga secretora del dominio V1/V2 dependiente de glicosilación en tres subtipos se VIH-1

Ana Ximena Zapata<sup>1</sup>, Viviana Granados González<sup>2</sup>, Julien Claret<sup>2</sup>, Willy Berlier<sup>2</sup>, Nadine Vincent<sup>2</sup>, Frederic Lucht<sup>2</sup>, Christiane Defontaine<sup>2</sup>, Abraham Pinter<sup>3</sup>, Christian Genin<sup>2</sup>, Serge Riffard<sup>2</sup>, Silvio Urcuqui<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

El dominio V1/V2 de la proteína de envoltura gp120 de HIV-1 esta involucrado en el tropismo viral durante la infección. Se ha sugerido que la glicosilación del dominio V1/V2 permite el enmascaramiento de epitopes neutralizantes conservados y es necesaria para mantener la funcionalidad del virus. Además, participa en los cambios conformacionales tras la unión con los coreceptores y en la inducción de anticuerpos

neutralizantes. Sin embargo, a pesar de su importancia, éste dominio ha sido muy poco estudiado.

## OBJETIVO

Determinar el papel de la glicosilación del dominio V1/V2 en el reconocimiento de anticuerpos IgG de suero e IgA secretora, dirigidos contra el dominio V1/V2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de tres aislamientos primarios de HIV-1 de los subtipos A, B y C se amplificó por PCR la secuencia de DNA que codifican para el dominio V1/V2 de la gp120 y el producto se clonó en el vector pSecTag/FRT/V5-HisTOPO, el cual tiene la articularidad que favorece la secreción de proteínas. Una vez obtenido el respectivo contrato se utilizó para transfectar células CHO, las cuales tienen la capacidad de glicosilar las proteínas. La estructura de las proteínas V1/V2 recombinantes fue verificada usando dos anticuerpos monoclonales anti-V1/V2, uno dirigido contra epitopes lineales y el otro contra epitopes conformacionales, dependiente de la glicosilación. Para la deglicosilación, las proteínas recombinantes se trataron con PNGasa. La presencia de IgG de suero e IgA secretora específica para el dominio V1/V2 fue determinado por ELISA en 82 pacientes infectados por VIH-1.

## RESULTADOS

De los 82 pacientes infectados, 14 presentaron en suero y en saliva de parótida, IgG e IgA respectivamente, contra V1/V2; es decir, los pacientes presentan anticuerpos dirigidos contra la proteína V1/V2 glicosiladas. Cuando los mismos ensayos se realizaron con proteínas V1/V2 deglicosiladas, se observó un incremento en la reactividad de la IgG sérica para los subtipos A y C pero no para el subtipo B. Pero al evaluar la IgA secretora de saliva de parótida, se observó una disminución de la reactividad para las proteínas recombinantes deglicosiladas, de los tres subtipos virales. Nuestros resultados sugieren que el reconocimiento de los sitios glicosilados del dominio V1/V2 por la IgG sérica, es subtipo dependiente y que la glicosilación juega un papel importante en el reconocimiento de los dominios V1/V2.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que la glicosilación del dominio V1/V2 incluyen en la especificidad de los anticuerpos producidos durante la infección por VIH-1, dirigidos contra el dominio V1/V2.

1. Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia
2. Grupo de Inmunidad de Mucosas y Agentes Patógenos, Université Jean Monnet, Saint Etienne-Francia
3. Laboratorio de Virología Retroviral, Instituto de Salud Pública, Newark-New Jersey

Correspondencia: Grupo Inmunovirología. Sede de Investigación Universitaria. Universidad de Antioquia. Calle 62 # 52-59. Laboratorio 532 Medellín, Colombia.  
E-mail: ximena.zapata@gmail.com

## El factor nuclear 90 Interactúa con RRE y disminuye la replicación del HIV-1

Claudia P. Patiño<sup>1</sup>, Georges Laurent<sup>2</sup>, Danielle Hernandez-Verdun<sup>3</sup>, Ajit Kumar<sup>2</sup>, Silvio Urcuqui-Inchima<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

La replicación del VIH-1 es regulada transcripcional y post-transcripcionalmente; la proteína Rev juega un papel importante en este proceso. Rev interactúa con el Elemento de Respuesta a Rev (RRE), un RNA presente en los transcritos semiprocesados y sin procesar del VIH; esta interacción es fundamental para su exportación desde el núcleo. Usando el gen reportero CAT, nuestro grupo demostró que el Factor Nuclear 90 (NF90) afecta la exportación de ARN virales mediada por Rev. NF90 se ha identificado como un factor transcripcional, que regula positiva o negativamente la expresión de genes. Presenta en su región N-Terminal (N-Ter) una señal de localización nuclear (NLS) y una de exportación nuclear (NES), y en la región C-Terminal (C-Ter), dos dominios de unión a ARNdc (DRBD1 y DRBD2) y una región carboxiterminal pobre en arginina-glicina (RG-).

## OBJETIVO

Determinar si NF90 tiene afinidad por RRE y la capacidad de inhibir la replicación del VIH-1 in Vitro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El gen que codifica por NF90 y diferentes regiones del mismo, se amplificaron por PCR y se clonaron en pmRFP. Para los estudios de interacción, se utilizó pGag-RRE, el cual produce un transcrito con RRE y su exportación hacia el citoplasma depende de una proteína que interactúe con RRE. Igualmente se usó pGFP/Rev, el cual codifica por

Rev fusionado a pGFP. Para determinar el efecto de NF90 o sus derivadas en la replicación del VIH-1 in vitro, se utilizó pHIV.Env.GFP el cual codifica por las proteínas del VIH-1 excepto la proteína de envoltura; además contiene el gen que codifica por la proteína GFP. La expresión de cada constructo se verificó transfectando células HeLa usando el kit Lipofect-Amine Reagent (GIBCO). Veinticuatro horas después, se evaluó la transfección, por microscopia de fluorescencia y en algunos casos, la expresión de las proteínas de interés por Western Blot.

## RESULTADOS

Nuestros resultados muestran que NF90 y en particular las regiones NES, DRBD1+2 y RG(-) presentan una alta afinidad por RRE, teniendo en cuenta que RRE es el ligando natural de Rev, examinamos si la co-expresión de Rev y NF90 o sus derivadas, en presencia de pGag-RRE, incrementa o disminuye la expresión de Gag. La co-expresión de ambas proteínas conlleva a una fuerte disminución de la expresión de Gag. Este efecto inhibitorio de la actividad de exportación de Rev, fue mayor cuando NF90 o sus derivadas se co-expresaron en presencia de la región N-Terminal. Además, también se observó una disminución de la expresión de Rev. Igualmente se encontró que NF90 y en particular las regiones C-Ter, DRBD 1 y DRBD 2 afectan la replicación del VIH-1 cuando se co-expresaron en presencia de la región N-Ter.

## CONCLUSIÓN

Nuestros resultados muestran que NF90 afecta la replicación del VIH-1 in vitro. El efecto es mayor cuando se co-expresa con la región N-Ter. Dicho efecto podría ser consecuencia de la interacción de NF90 por RRE o un efecto en el ensamblaje del complejo de exportación mediado por Rev. Sin embargo, son necesarios otros estudios que permitan entender mejor el o los mecanismos implicados.

1. Grupo Inmunovirología - Universidad de Antioquia, Colombia.

2. Biochemistry, Molecular Biology and Genetics – Georges Washington University, USA. 3.Nuclei and Cell Cycle - Institut Jacques Monod, France.

Correspondencia: Grupo Inmunovirología. Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín. Colombia.

E-mail: cpatgno@virologia.udea.edu.co

## Evaluación de la actividad funcional de los TLR, en células mononucleares de sangre periférica expuestas al VIH-1

Diana Marcela Giraldo<sup>1</sup>, Juan C. Hernández<sup>1</sup>,  
Silvio Urcuqui-Inchima<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los receptores tipo Toll (TLR) intervienen en el reconocimiento de estructuras específicas de patógenos e inician la respuesta inmune innata, a través de la expresión de citoquinas proinflamatorias. Además los TLR participan en la maduración de las células dendríticas. Estudios previos realizados en nuestro Grupo han demostrado que el VIH-1 puede modular la expresión de TLR2 y TLR4 en subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas de pacientes infectados con VIH-1. Sin embargo, se desconoce si esa regulación tiene o no un efecto en la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas proinflamatorias, que favorezcan o alteren el establecimiento de la inmunidad innata.

## OBJETIVO

Cuantificar el mRNA de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  y la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, en CMSP tratadas con agonistas de TLR2 y TLR4, expuestas o no al VIH-1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Inicialmente se estandarizó las condiciones de la RT-PCR convencional y en tiempo real (verificadas por electroforesis en gel de agarosa) para cuantificar el mRNA de las citoquinas proinflamatorias en CMSP estimuladas con PMA/Ionicina. Luego se estimuló los CMSP con agonistas de TLR2 y TLR4 (lipoproteína sintética -PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>- y lipopolisacárido - LPS-, respectivamente) durante 12 y 18 horas y se cuantificó el mRNA IL-6 y TNF- $\alpha$  por RT-PCR en tiempo real. La expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en monocitos, células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC) igualmente estimuladas, se determinó por citometría de flujo.

## RESULTADOS

Se observó un incremento del mRNA de IL-6 y TNF- $\alpha$  en CMSP estimuladas por 18h con PMA/Ionicina. Al estimular las CMSP con PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (agonista de TLR2) y LPS agonista de TLR4) se observó un mayor expresión del mRNA para IL-6 a las 12h de estímulo, pero a las 18h disminuyó drásticamente. Por el contrario, el incremento del mRNA para TNF- $\alpha$  se mantuvo constante en los dos tiempos evaluados. El nivel de expresión de CD80 y CD86 se evaluó en las tres poblaciones celulares estimuladas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se observó un incremento de la expresión de CD80 y CD86 en mDC y en monocitos, pero no en pDC. Nuestros resultados sugieren que las mDC y monocitos al ser estimulados con los agonistas de TLR2 y TLR4 adquieren un fenotipo de maduración/activación, lo cual no sucede con las pDC.

## CONCLUSIÓN

La estimulación de TLR2 y TLR4 con los agonistas PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> y LPS, respectivamente, activa la expresión de citocinas proinflamatorias y la maduración/activación de mDC y monocitos, indicando la funcional de los TLR. Con base en nuestros resultados, el paso siguiente es estimular las CMPS con VIH-1 y posteriormente tratarlas con los agonistas de TLR2 y TLR4 y así determinar el efecto del VIH-1 en la actividad funcional de los dos TLR.

1 Grupo Inmunovirología. Universidad de Antioquia  
Correspondencia: Diana Marcela Giraldo, calle 65B # 39-19  
Villa Hermosa, Medellín. Antioquia.  
E-mail: diana2g@gmail.com

## Potencial patógeno del virus dengue serotipo 3 en el departamento de Santander, Colombia

Ángela Torres<sup>1</sup>, Sergio Yebrail Gómez<sup>1</sup>, Christian Julián Villabona-Arenas<sup>2</sup>, Daniel Rafael Miranda-Esquivel<sup>2</sup>, Raquel Elvira Ocazonez<sup>1</sup>

## OBJETIVO

Investigar la predominancia relativa del virus dengue serotipo 3 (DEN-3) en relación con la frecuencia del dengue hemorrágico (DH), y la divergencia genéticamente de la cepa con relación a la severidad del dengue y a cepas de países de Latinoamérica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se hicieron intentos de aislamiento del virus dengue en células de mosquito (C6/36) a partir de 600 sueros de casos febriles, los cuales fueron captados a través del sistema de vigilancia de la Secretaría de Salud de Santander entre Enero del 2007 y Julio del 2008. El virus aislado se tipificó por RT-PCR y la frecuencia anual de DH fue la reportada por la Secretaría de Salud local. En casos con aislamiento se buscaron anticuerpos IgG anti-dengue en el suero de fase aguda usando el estuche ELISA-IgG (PANBIO E-DEN1G). Se hizo análisis filogenético usando “maximum likelihood” y “parsimony” con 60 secuencias depositadas en GenBank del gen de la proteína E de VDEN-3 aislados de casos de DH y clásico de Santander (n = 10) y virus de países de América (n = 34) y Asia (n = 16).

## RESULTADOS

Se aislaron virus DEN-1 (n = 23), -2 (n = 9) y -3 (n = 15) pero no DEN-4. La infección primaria fue más frecuente en infectados con DEN-1 (89,4%) y -3 (78,5%) que con DEN-2 (55,6%). En 2007 el DEN-3 (42,2%) fue predominante seguido por DEN-1 (36,3%) y DEN-2 (21,2%), pero en 2008 el DEN-1 (78,5%) fue el más aislado seguido por el DEN-2 (14,2%), en tanto que el DEN-3 (7,1%) fue el menos prevalente. Esta abundancia relativa de serotipos coincidió con marcado incremento en la frecuencia del DH con respecto a años previos. De 4,6% (861/18.663) en 2002-2004 (DEN -3: 87,8%; -2: 5,4%; -1: 2,7%) a 25,9% (7746/2007) en 2007-2008 (DEN -1: 48,9%; -3: 31,9%; -2: 19,1%). El análisis de secuencias mostró que: 1) virus de Santander fueron genotipo III y 2) no hubo divergencia del gen E en relación con severidad del dengue, pero virus de Santander agruparon junto a virus de Venezuela, Nicaragua y México donde casos de DH por DEN-3 ha sido raros y aparte de aislados de Brazil, Cuba y Paraguay donde el serotipo ha causado muertes.

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la presencia del DEN-3 en Santander contribuyó en menor proporción al incremento del DH en 2007-2008 y al contrario el DEN-1. Cepas DEN-3 de Santander divergieron genéticamente de cepas del mismo serotipo asociadas a epidemias de DH y muertes en países vecinos.

## AGRADECIMIENTOS

**Financiación:** Universidad Industrial de Santander proyecto # 5636-2007 y parcialmente por la Gobernación de Santander, Secretaría de Salud, proyecto # 2007-068-000-0070.

1. Universidad Industrial de Santander, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales – CINTROP .

2. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Biología, Laboratorio de Sistemática & Biogeografía.

Correspondencia: Laboratorio de Arbovirus, Centro de investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguara Km2. Autopista Piedecuesta. E-mail: raqueoca@hotmail.com

## Detección del perfil de citoquinas en líquido cefalorraquídeo de niños nacidos de madres VIH-1 positivas

Mario E Archila Melendez<sup>1,2</sup>, Cristhian Gomez Castillo<sup>2</sup>, g Rugeles<sup>1</sup>, William Cornejo<sup>2</sup>, Jaime Carrizosa<sup>2</sup>, Maria Teresa Rugeles<sup>1</sup>  
Carlos Pardo-Villamizar<sup>3</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) está asociada a alteraciones inmunológicas y neurológicas. A pesar que la infección por VIH-1 afecta linfocitos y monocitos, células del sistema nervioso central (SNC) como la microglia son susceptibles a la infección. La exposición intrauterina al VIH-1, independiente de la transmisión vertical, induce alteraciones inmunes en neonatos. Estos cambios, particularmente en las citoquinas, podrían afectar el desarrollo del SNC.

## OBJETIVO

Establecer si el riesgo de exposición al VIH-1 durante el embarazo en niños nacidos de madres VIH-1-positivas influencia el perfil de citoquinas y quimoquinas. Determinar si anomalías en este perfil influencia el neurodesarrollo de estos niños.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo, observacional de niños expuestos y no expuestos al VIH-1 in útero. Todas las madres recibieron antirretrovirales durante el embarazo, parto y

fueron sometidas a cesárea electiva. Todos los infantes recibieron antirretrovirales orales durante las primeras seis semanas de vida y fueron alimentados con sucedáneo de leche materna. El neurodesarrollo fue evaluado solo en el grupo de niños expuestos mediante la escala de desarrollo infantil de Bayley, BSID II a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses de edad. El líquido cefalorraquídeo (LCR) se obtuvo en el grupo de niños expuestos al mes y doce meses de edad, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización. De igual forma fueron recolectadas muestras de LCR al mes de edad, de infantes hijos de madres con ELISA negativo para VIH-1 y sin evidencia de inflamación o infección del SNC. El análisis de proteínas se realizó con tecnología de citometría de flujo con micro-perlas para la detección múltiple de citoquinas y quimoquinas (Luminex®). El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS. Basados en los parámetros de normalidad se realizó la prueba paramétrica t de student y no paramétrica de Mann Whitney. Resultados: Se tomaron 15 muestras de LCR al mes y 12 a los doce meses de edad en el grupo expuesto y 37 muestras al mes de niños no expuestos. Encontramos un incremento significativo en la concentración de la proteína quimo-atrayente-1 (MCP-1), al mes de edad en LCR de los niños expuestos comparado con el grupo de no expuestos  $p = 0,04$ . No hubo diferencia significativa en las concentraciones de otras citoquinas incluyendo las citoquinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, IL-5 e IL-7. Al correlacionar la concentración de MCP-1 al mes de edad en LCR de niños expuestos con el neurodesarrollo, encontramos que los niños con retraso en el índice de desarrollo psicomotor mostraban niveles significativamente más bajos que los niños sin retraso ( $p = 0,024$ ). Conclusiones: Los resultados sugieren que existe un incremento de la quimoquina MCP-1 en niños expuestos al VIH-1 durante la gestación y este incremento puede estar asociado a anomalías del sistema neuroinmune que influencia el desarrollo del SNC. Estudios futuros deben clarificar el papel de la MCP-1 como factor modulador neuronal, su influencia en el neurodesarrollo y su uso potencial como biomarcador de anomalías del desarrollo.

Fuente de Financiamiento: Colciencias código 1008 81088

1. Grupo de Inmunovirología,

2. Grupo de Neuropediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

3. Laboratorio de Neuroinmunopatología, Departamento de Neurología y Patología, Hospital Johns Hopkins, Escuela de Medicina, Universidad Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

Correspondencia: Carrera 53 # 61-30, Torre 2, Laboratorio 532. Sede de investigación Universitaria -SIU-, Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.  
E-mail: marioarchila@gmail.com

## El Mimetismo molecular de la proteína tax del HTLV I y su asociación con la patogénesis de la PET/MAH

Martha C. Domínguez, Juliana Soto, Miyerlandy Torres, Gina Guerra, Oscar M Tamayo, Adalberto Sánchez y Felipe García Vallejo

### INTRODUCCIÓN

Los virus comparten sitios antigénicos con componentes normales de las células hospedadoras; este fenómeno, que se denomina mimetismo molecular, juega papel importante en la patogénesis de algunas enfermedades de origen viral. La Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatía asociada al HTLV-I (PET/MAH) es una mielopatía inflamatoria crónica de la médula espinal, caracterizada por reclutamiento perivascular de células monoculares acompañada por infiltración linfocitaria parenquimal. Sin embargo a pesar de muchos estudios previos, todavía su patogénesis no es completamente entendida.

### OBJETIVOS

Obtener evidencias que el mimetismo molecular de la proteína Tax, es parte de la patogénesis de la PET/MAH.

### METODOLOGÍA

A partir de muestras de plasma de 37 pacientes PET/MAH, 10 ATL (Leucemia de Células T del Adulto), 22 individuos portadores asintomáticos y 20 seronegativos para el HTLV-I, se determinaron niveles plasmáticos de anticuerpos ANA y ACL-2 y niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4. Se efectuaron análisis de western blot a proteínas extraídas de distintos tejidos del SNC y de otros tejidos con un anticuerpo monoclonal de Tax (LT4). Adicionalmente, mediante inmunohistoquímica, se confirmó la localización dentro de médula espinal de rata de la reacción cruzada con el monoclonal LT4. Mediante experimentos de "Phage Display" utilizando una biblioteca de fagémidos que expresan secuencias de 12 aminoácidos combinadas al azar, se seleccionaron clones que tuvieron una fuerte reacción cruzada con el monoclonal anti-Taxp40 LT4.

### RESULTADOS

El 70,2% y el 83,8% de los pacientes PET/MAH fueron reactivos para anticuerpos ANA y ACL-2 respectivamente en contraste con los ATL y los seropositivos asintomáticos ( $P < 0,001$ ). Además, el 70,3 ( $P < 0,001$ ) y el 43,2% de los pacientes PET/MAH tuvieron niveles detectables de IFN- $\gamma$  and IL-4 respectivamente. Se determinó la reactividad cruzada con el anticuerpo monoclonal anti-tax LT4p40 en una proteína de PMr 33-35 Kda exclusivamente de preparaciones de proteínas de componentes celulares de médula espinal de humanos y de ratas. El anticuerpo LT4 anti tax-p40 y plasmas de PET/MAH mostraron la reacción cruzada con PMr 33-35 Kda obtenida del núcleo de neuronas de la médula espinal de ratas Wistar sanas. Por inmunohistoquímica se determinó que la reacción cruzada con el anti-tax LT4 se localizó en el núcleo de neuronas de la región dorsal (lámina V), en la intermedia lateral y medial (lámina VII) y ventral lateral y medial (Lámina IX). En la región torácica y lumbosacra se distinguieron morfológicamente, dos grupos de neuronas motoras grandes que mostraron la reactividad cruzada con LT4. La secuenciación de fagémidos recombinantes que reaccionaron con LT4 y su posterior traducción mediante el código nuclear, mostró una secuencia consenso SNANYTTPFMPG. Aplicando métodos de alineamiento y modelación tridimensional, se encontró que tres proteínas del SNC, comparten alta homología con el péptido motivo, una de ellas se localiza en el núcleo de neuronas.

### CONCLUSIÓN

En su conjunto los resultados demuestran la existencia del mimetismo molecular entre la proteína Tax del HTLV-I y proteínas nucleares de neuronas del SNC. Además son una evidencia poderosa que este mimetismo molecular juega un papel central en la patogénesis de la PET/MAH. Este trabajo fue cofinanciado por Colciencias y la Universidad del Valle.

Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali. E-mail: labiomol@gmail.com

Correspondencia: Martha C Domínguez. Laboratorio de Biología molecular y Patogénesis, Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. calle 4B # 36-00. Sede de San Fernando. Cali. Colombia.

E-mail: mcdoming58@hotmail.com

# **Evaluación *In Vitro* de secuencias de rna interferente contra blancos estratégicos del gen *Nef* del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.**

Lenis Alvarez<sup>1</sup>, María Eugenia Cardona<sup>1,2</sup>, Abdalla M Jama<sup>2</sup>, C.I Edvard Smith<sup>2</sup>, H Jose Arteaga<sup>1,2</sup>.

## **OBJETIVO**

Diseñar y generar secuencias de RNA interferente (RNAi) contra blancos estratégicos del gen *nef* del VIH-1 con baja probabilidad de generar mutantes resistente al efecto interferente, y evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de la expresión de dicho gen con miras a posibles aplicaciones de Terapia Génética contra la infección por VIH-1.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se seleccionaron como blanco, secuencias del gen *nef* del VIH-1, cepa HXB2 (GenBank K03455) que codifican para regiones altamente conservadas de la proteína e indispensables para interacciones funcionales de esta con proteínas celulares, basándose en la homología con las secuencias consenso de VIH-1 presentes en la base de datos del Laboratorio Los Alamos\*. Los RNAi se diseñaron utilizando la herramienta siSearch \*\*. Se generaron vectores de expresión utilizando un plásmido retroviral (pRetro.super) para la transferencia a células de mamífero de unidades genéticas codificadoras de RNAs en forma de pinza (shRNAs del inglés *short hairpin RNA*) bajo el control transcripcional del promotor H1. Los shRNAs son transcritos de una secuencia de DNA de 64 pb, la cual contiene un oligonucleótido de 19 pb en orientación tanto sentido como antisentido, separados por un espaciador de 9 pb. Estos vectores liberan RNAi a partir de los shRNAs. La funcionalidad de los vectores y la eficiencia de los RNAi generados, se evaluó en ensayos de cotransfección de células 293T, con un plásmido portador de un gen reportero, codificador de una proteína de fusión de una forma desestabilizada de la GFP y Nef bajo el control transcripcional de una variable disregulada del promotor

CMV, dotado de alta actividad transcripcional. Esto permite simular condiciones de inhibición contra una alta expresión del gen blanco. El nivel de inhibición se evaluó 72 horas después mediante Citometría de Flujo.

## **RESULTADOS**

De acuerdo a los criterios propuestos fueron identificadas 3 regiones blanco: (i) señal de miristilación; (ii) sitio de unión de la proteína Nef a dominios SH3 de proteínas involucradas en señalización celular; (iii) región rica en Prolina de unión a Kinasas de la familia Src. Contra cada región se generó más de una molécula de shRNA. Como controles se diseñaron 3 shRNAs contra regiones no conservadas. Adicionalmente, se construyó un shRNA que codifica para un microRNA propio del VIH-1. En los experimentos de cotransfección se identificaron 8 vectores que mostraron inhibiciones entre el 20 y 54% de la expresión del gen reportero sobrepresado.

## **DISCUSIÓN**

Se ha demostrado ampliamente el efecto inhibitorio de la replicación del VIH-1 mediado por RNAi contra diversas regiones del genoma viral. Uno de los principales obstáculos para una aplicación de esta tecnología en terapia genética contra la infección de VIH-1 es la generación de mutantes resistente al efecto del RNAi, debido a la alta tasa de replicación y mutación del virus. Puesto que esta aproximación requiere complementariedad del RNAi con su blanco. El gen *nef* ha sido también ampliamente evaluado con resultados similares.

Nuestra estrategia consiste en diseñar moléculas de RNAi contra secuencias conservadas y críticas para la funcionalidad de la proteína Nef, de tal manera que debido a la multifuncionalidad de esta proteína, el tratamiento con RNAi pudiera conducir a la aparición de mutantes disfuncionales de baja virulencia. Nuestros vectores están siendo evaluados *in vitro* en líneas celulares establemente modificadas y crónicamente infectadas con VIH-1.

Departamento de Ciencias Básicas. Grupo de Inmunología y Medicina Molecular, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

Department of laboratory medicine, Clinical Research Center, Karolinska Institutet, Sweden.

Correspondencia: Carrera 32 # 29-31- oficina 206, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga

Email contacto: lenis.alvarez@gmail.com

## Efecto de la administración de metilprednisolona sobre el nivel de citocinas en pacientes con síndrome febril agudo tipo dengue

Carolina Coronel-Ruiz<sup>1</sup>, Luis Ángel Villar-Centeno<sup>2</sup>,  
Ruth Aralí Martínez-Vega<sup>3</sup>,  
Fredí Alexander Díaz-Quijano<sup>3</sup>.

### OBJETIVO

Determinar si en individuos con síndrome febril agudo tipo dengue los niveles de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) difieren en el grupo que recibe Metilprednisolona comparado con los grupos control.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo Clínico Factorial 2x2, en  $\geq 5$  años con síndrome febril agudo tipo dengue de  $\leq 120$  horas de evolución sin signos de extravasación plasmática, de la zona Metropolitana de Bucaramanga. Se realizó aleatorización estratificada por edad ( $<15/\geq 15$  años) y recuento plaquetario ( $\leq 100.000/>100.000$  plaquetas/mm<sup>3</sup>) a una de 4 combinaciones (Metilprednisolona-N-acetilcisteína, Metilprednisolona-placebo, N-acetilcisteína-placebo, placebo-placebo). Se tomó suero en la evaluación basal (pre-intervención) y entre las 48 y 72 horas postintervención y se almacenó a -70°C hasta el momento de determinación de los niveles de citocinas a través de ensayo inmunométrico enzimático secuencial en fase sólida por quimioluminiscencia. El diagnóstico de dengue se hizo con pruebas de ELISA IgM para dengue en muestras pareadas, aislamiento viral o RT-PCR. Se comparó el nivel de IL-6 y de TNF- $\alpha$  del grupo de Metilprednisolona-placebo contra los grupos N-acetilcisteína-placebo y placebo-placebo preintervención y postintervención. Adicionalmente, se compararon en estos mismos grupos los niveles basales de IL-1 $\beta$  de IL-8.

### RESULTADOS

Se realizó la determinación de IL-6 en 92 pacientes (24% Metilprednisolona, 75% Control) y TNF- $\alpha$  en 84 pacientes (29% Metilprednisolona, 71% Control). A 80 de los 92 pacientes, se les determinó los niveles de IL-1 $\beta$  y de IL-8 (29% Metilprednisolona, 71% Control). No se evidenció asociación entre la intervención y los niveles

de citocinas. Se encontró asociación entre los niveles de citocinas basales y los niveles de plaquetas durante el seguimiento, así: IL-1 $\beta$  se asoció positivamente con el recuento a las 72 horas postintervención, de igual manera la IL-8 se encontró asociada en los tres días siguientes a la intervención; mientras que el TNF- $\alpha$  y la IL-6 se relacionaron de forma inversa con el recuento de plaquetas a las 24 horas, y a las 48 y 72 horas postintervención, respectivamente ( $p < 0,05$ ).

Ajustando por el nivel citocinas, el recuento plaquetario basal, la edad y el género, el uso de Metilprednisolona se asoció a un mayor nivel de plaquetas a las 24 y 48 horas postintervención.

### CONCLUSIÓN

Los fármacos evaluados no se asociaron a un cambio en los niveles de citocinas. Sin embargo, su medición temprana parece tener utilidad pronóstica. Adicionalmente, se observó un aumento de las plaquetas en los pacientes que recibieron Metilprednisolona.

<sup>1</sup> Bacterióloga. Estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad Industrial de Santander.

<sup>2</sup> MD, MSc. Profesor Titular, Escuela de Medicina. Universidad Industrial de Santander.

<sup>3</sup> MD, MSc. Centro de Investigaciones Epidemiológicas. Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Carrera 32 # 29-31 Tercer piso, Oficina 304. Centro de Investigaciones Epidemiológicas. Facultad de Salud. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Colombia. E-mail: caritocruiz@hotmail.com

## Estudio de las subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con enfermedad por virus dengue

Gerardo A. Libreros<sup>1</sup>, Fabián Méndez<sup>2</sup>,  
Beatriz Parra<sup>1</sup> y Anilza Bonelo<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

El Dengue Hemorrágico (FHD), enfermedad causada por el Virus Dengue (VD), es considerado un problema de salud pública en países tropicales y subtropicales. Actualmente no se cuenta con tratamiento antiviral ni con vacuna contra FHD y los mecanismos fisiopatológicos no son comprendidos completamente; sin embargo, se propone que es una inmunopatología inducida principalmente durante las infecciones secundarias

por VD. No es claro el papel de la respuesta inmune en la protección o en la patogénesis de la enfermedad, en particular, las subpoblaciones de LT, que se activan durante la fase aguda de la enfermedad. La mayoría de estudios al respecto provienen de análisis de marcadores de activación celular solubles en el plasma de pacientes del sudeste asiático.

## OBJETIVOS

Caracterizar el fenotipo de activación de las subpoblaciones de LT durante la enfermedad por VD y examinar mecanismos de generación de Linfocitos T Doble Positivo durante la fase aguda de la enfermedad.

## METODOLOGÍA

Estudio descriptivo en el que se analizaron por citometría de flujo marcadores fenotípicos de LT en 52 pacientes con dengue, 30 dengue clásico y 22 Dengue hemorrágico. Se determinaron los porcentajes de LT CD4+ y LT CD8+, la frecuencia (%) y nivel de expresión (MFI) de la molécula CD69. La activación inmunológica de los LT CD8+ se determinó por la inversión en la relación CD4/CD8 y las diferencias en el nivel de expresión de la molécula CD69 (MFI) entre las subpoblaciones de LT. Finalmente, para explicar la presencia de LTDP durante dengue, se analizó la relación existente entre el fenotipo activado de los LT CD8+ y el estado de infección (latente o reactivado) por herpesvirus en dichos pacientes mediante ELISA IgG específica a HHV-6, EBV y CMV o Detección Del Genoma En Sangre Y Plasma Mediante PCR Anidado.

## RESULTADOS

Se demostró una mayor activación de la subpoblación de LT CD8+ que de LT CD4+ durante la fase aguda del dengue, evidenciado por la inversión en la relación CD4/CD8 y un incremento significativo en la frecuencia de LT CD8+CD69+ y del MFI de CD69, durante la fase sintomática de la enfermedad comparado con los LT CD4+. Se determinó que el fenotipo de los LTDP presentes en dengue corresponde a LT CD8altoCD4bajo, lo que sugiere que estas células se originaron posiblemente a partir de LT CD8+ activados. No se encontró relación entre la presencia de LTDP y la infección latente o reactivada por herpesvirus; sin embargo, se pudo demostrar una relación entre la presencia y porcentaje de LTDP y la magnitud de activación de los LT CD8+ medido por la relación CD4/CD8 y la frecuencia de LT CD8+ CD69+.

## CONCLUSIONES

Los resultados son consistentes con la hipótesis de que durante la fase aguda de la infección por VD existe una mayor activación de la subpoblación de LT CD8+ comparado con los LT CD4+. La presencia de LTDP durante la fase sintomática del dengue está relacionada con la activación inmunológica de los LT CD8+ y este fenómeno es más frecuente en los individuos con la forma severa de la enfermedad.

1. Grupo Virem. Virus Emergentes y Enfermedad. Universidad del Valle

2. Grupo GESP. Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional. Universidad del Valle

Correspondencia: Anilza Bonelo. Grupo VIREM, Departamento de Microbiología. Edificio 120. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede de San Fernando. Cali. Colombia.

E-mail: anbonelo@yahoo.com

## Análisis fenotípico de linfocitos T dobles positivos (LTDP) de sangre periférica en pacientes con dengue

Gerardo A. Libreros<sup>1</sup>, Rodrigo Zambrano<sup>1</sup>, Mario Barbosa<sup>1</sup>, Fabián Méndez<sup>2</sup>, Beatriz Parra<sup>1</sup> y Anilza Bonelo<sup>1</sup>

## INTRODUCCION

El Dengue Hemorrágico (FHD), enfermedad causada por el Virus Dengue (VD), es considerado un problema de salud pública en países tropicales y subtropicales del mundo. Actualmente no se cuenta con tratamiento antiviral ni con una vacuna contra esta enfermedad. Los mecanismos fisiopatológicos de FHD no son comprendidos completamente, sin embargo, se propone que es una inmunopatología inducida principalmente durante las infecciones secundarias por VD. No es claro el papel que cumplen los diferentes componentes de la respuesta inmune en la protección o en la patogénesis de la enfermedad, en particular las diferentes subpoblaciones de LT, que se activan durante la fase de síntomas de la enfermedad. Los Linfocitos T Dobles Positivos (LTDP) son una subpoblación de Linfocitos T de sangre periférica que se encuentran aumentados en la mayoría de individuos con Dengue Hemorrágico (FHD). Estas células se han encontrado

con mayor frecuencia durante la fase de defervescencia del dengue; periodo que coincide con el aumento en la permeabilidad vascular característico del FHD. Hasta el momento se desconoce el papel de los LTDP en la patogénesis de FHD o en la eliminación del virus

## OBJETIVO

Este trabajo pretende caracterizar el fenotipo de los LTDP de sangre periférica en pacientes con Dengue y relacionarlo con las funciones que estas células podrían desempeñar *In vivo*.

## METODOLOGIA

Se realizó la captación y toma de muestra de sangre periférica de 12 pacientes con la enfermedad por VD. Las muestras de sangre completa o PBMC de dichos pacientes se tiñeron para determinar la expresión de moléculas de activación como HLA DR; CD56; CD28 y CD69. Moléculas de asentamiento a nódulos linfoides como CD62L y CCR7. Marcadores efectores y de memoria como CD45RO Y CD45 RA y marcadores de maduración como CD1a y marcador de diferenciación como CD57. Todos estos marcadores se tiñeron con las moléculas CD3; CD4 y CD8.

## RESULTADO

Los LTDP en sangre periférica de pacientes con dengue expresan marcadores de LT de memoria efectora (CCR7- CD62L bajo CD45RA- CD45RO+). LTDP en dengue expresan marcadores de activación celular (HLADR+, CD28+) en igual o mayor proporción que los LT CD4+ y LT CD8+ Simples Positivos. LTDP no expresan CD1a por lo que no son LT inmaduros liberados prematuramente del timo. LTDP tienen un mayor nivel de diferenciación que LT CD4+ y LT CD8+ de acuerdo a su expresión de CD57

## CONCLUSION

Los LTDP de sangre periférica de pacientes con la enfermedad por VD son Linfocitos maduros, diferenciados, activados y de memoria efectora que podrían estar contribuyendo a la patogénesis del Dengue.

Los autores del trabajo "Análisis Fenotípico de Linfocitos T Dobles Positivos (LTDP) de Sangre Periférica en Pacientes con Dengue" autorizamos publicar el resumen del trabajo en la revista VIDA de la UIS.

Correspondencia: Anilza Bonelo. Grupo VIREM, Departamento de Microbiología. Edificio 120. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede de San Fernando. Cali. Colombia. E-mail: anbonelo@yahoo.com

## Rúbricas genómicas de la integración del virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1)

Ángela Peña, Juliana Soto, Mercedes Salcedo, Adalberto Sánchez, Martha C. Domínguez y Felipe García Vallejo.

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte del genoma de la célula hospedera es accesible a la integración retroviral; sin embargo, actualmente se propone que este proceso no es aleatorio. Estudios previos, muestran que el ADN del VIH-1 se integra preferentemente dentro de regiones del genoma celular que tienen una elevada actividad transcripcional y una alta densidad génica. Sin embargo, aún no se conocen detalladamente las características estructurales y funcionales de la cromatina celular asociada a zonas con una mayor frecuencia de integración proviral.

## OBJETIVOS

Caracterizar el ambiente genómico de regiones del ADN humano que presentan una alta frecuencia de integración del VIH-1. Metodología: Utilizando el programa BLAT del Genome Browser de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC), para obtener información de genes identificados (RefSeq), su localización cromosómica, función génica, proceso molecular asociado y localización celular; además de secuencias repetitivas (LINEs, SINEs, y otras), se analizaron 300 secuencias con extremos LTR-VIH flanqueantes provenientes de macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células Jurkat infectadas con el virus. Todas las secuencias de nucleótidos empleadas en este trabajo, están depositadas en el GenBank (NCBI). A partir de esta información se hizo un paseo cromosómico ("chromosome walking") en una extensión de 20 Kb en cromatina asociada con elevada frecuencia de integraciones ("hotspot").

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en el patrón de integración proviral en los cromosomas de los tres tipos celulares estudiados ( $p > 0.05$ ). Con excepción del cromosoma Y, se detectó al menos una integración en el resto de cromosomas. El 45% (118/263) del total de los provirus se localizaron en los cromosomas de los grupos A (1, 2, 3) (60/263), B (4) (17/263) y C (7, 12) (41/263). De un total de 148 genes referenciados en el GO, el 52,4% codifica por proteínas cuya función es la unión a otras moléculas y el 21,5% por enzimas. El 30% de los productos génicos se localizan en el citoplasma, el 26% en el núcleo y el 24% en sistemas membranosos. Se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de integración en regiones que contienen genes asociados al ciclo celular, a transducción de señales y a transporte en células Jurkat con respecto a los otros dos tipos celulares ( $p < 0,01$ ). La integración en secuencias repetitivas fue de 42.3% y 44% para LINEs y SINEs respectivamente. Adicionalmente, se detectaron 6 zonas preferenciales de integración localizadas en los cromosomas 2, 6, 8, 12 y 17. Éstas se caracterizaron por tener una alta densidad génica, un elevado porcentaje de islas CpG y de secuencias repetidas, mostrando que corresponden a porciones de activa transcripción en donde la cromatina sufre una remodelación generando zonas descondensadas.

## CONCLUSIONES

Este estudio permitió analizar comparativamente, desde el punto de vista genómico, las características del proceso de zonas de alta frecuencia de integración en tres tipos distintos de células. Las diferencias encontradas establecerían una base para entender, a nivel genómico, los mecanismos moleculares asociados con la patogénesis del SIDA/VIH.

---

Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud. Universidad del Valle. Cali. Colombia. E-mail labiomol@gmail.com

Correspondencia: Juliana Soto. Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede de San Francisco. Cali. Colombia. E-mail: dendroapsis@gmail.com

---

## Genómica de la integración retroviral

Felipe García Vallejo

### INTRODUCCIÓN

El desciframiento del genoma humano aunado al conocimiento progresivo de su estructura y función, ha permitido estudiar el proceso de integración del ADN viral y la naturaleza de sus blancos genómicos en las células hospederas de manera más amplia y sistémica. Actualmente se postula que la integración del ADN viral en el genoma celular depende de algunas características de la cromatina que definen sitios con mayor posibilidad de integración.

### OBJETIVOS

Utilizando dos modelos de retrovirus humanos: el HTLV-Iy el VIH-1, obtener evidencias sobre las características del Genoma humano que favorecen la integración retroviral.

### METODOLOGÍA

Mediante amplificación por IPCR o LMPCR y secuenciación del ADN humano flanqueantes a secuencias LTR de estos provirus (300 para el VIH-1 y 90 para el HTLV-I), se han realizado estudios de caracterización de esta cromatina, de los genes asociados, de sus funciones, localización y proceso molecular en el que participan, además de identificar las secuencias repetidas y las potenciales regiones de activa transcripción de genes.

### RESULTADOS

Nuestros resultados muestran que el VIH-1 se integra preferencialmente en de regiones del ADN de la célula infectada que tienen una alta actividad transcripcional y una elevada densidad génica. De un total de 148 genes referenciados en el GO, el 52,4% codifica por proteínas cuya función es la unión a otras moléculas y el 21,5% por enzimas. El 30% de los productos génicos se localizan en el citoplasma, el 26% en el núcleo y el 24% en sistemas membranosos. Se encontraron diferencias

significativas en las frecuencias de integración en regiones que contienen genes asociados al ciclo celular, a transducción de señales y a transporte en células Jurkat con respecto a los otros dos tipos celulares ( $p < 0,01$ ). Con el fin de caracterizar y probar esta hipótesis en el caso de la infección por el HTLV-I asociada con la PET/MAH, se hizo un estudio bioinformático en 90 secuencias IPCR procedentes de DNA de linfocitos de sangre periférica (PBMC) de pacientes PET/MAH y portadores asintomáticos naturalmente infectados. Los análisis mostraron que en los PET/MAH existe una integración preferencial en los cromosomas 19 (18,5%), 10 y 16 (6,8%). Se encontraron diferencias significativas entre los sitios de integración entre los pacientes PET/MAH y los asintomáticos. En los PET/MAH las regiones flanqueantes a los sitios de integración son regiones codificantes para los genes *JuncB*, *ZNF282*, *ZNF274* y *ZNF754*, *ASNA* (proteína de transporte y translocación de ATP), *hMSH2* y *MLH1* (genes de reparación de ADN), *GPSN2* (Glicoproteína Sináptica 2) y *DB1* (proteína de enlace a acetilcolina); en los portadores asintomáticos el genoma adyacente correspondió a regiones de repetición tipo *Alu*, *L1*, *(CA)<sub>n</sub>* y secuencias *MIR*. Se demostró que existe una integración zonal diferencial como una característica de la PET/MAH.

## CONCLUSIÓN

Nuestros análisis permitieron establecer diferencias en los “estilos de integración” en los dos modelos estudiados. Además dan una base para entender, a nivel genómico, los mecanismos moleculares asociados con la patogénesis del SIDA/VIH y de la PET/MAH.

## AGRADECIMIENTOS

**Fuente de Financiamiento:** Trabajos cofinanciados por Colciencias y la VRI de la Universidad del Valle .

1. Profesor Titular. Director científico del Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de salud. Universidad del Valle. E-mail: labiomol@gmail.com  
Correspondencia: Laboratorio de Biología Molecular y Patogénesis. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Escuela de Ciencias Básicas. Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede de San Francisco. Cali. Colombia. E-mail: labiomol@gmail.com

## Inhibición de secreción y redistribución subcelular de proteínas del virus dengue por remodelación del citoesqueleto de actina en células tratadas con lovastatina

Alexandra Cuartas-López<sup>1</sup>. Juan C. Gallego-Gómez<sup>1,2</sup>.

### OBJETIVO

Determinar si el bloqueo la enzima HMG-CoA inhibe significativamente la infección con el virus Dengue.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### *Cultivos de líneas celulares*

Células Vero fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino a diferentes concentraciones, vitaminas, aminoácidos, L-glutamina, y bicarbonato de sodio. El medio de cultivo correspondiente a los ensayos de transfección no se suplementa con penicilina/estreptomycinina.

*Ensayo Inhibición de la HMG-CoA con Lovastatina en células infectadas o transfectadas con pCAGGS-NS4B y pCAGGS-ENV de DENV-2.*

Células previamente infectadas con DENV-2 o transfectadas con los plásmidos *pCAGGS-NS4B* y *pCAGGS-ENV*, fueron tratadas con diferentes concentraciones y tiempos con Lovastatina para observar el efecto en la inhibición del virus y distribución subcelular.

Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante, usando los plásmidos *pCAGGS*, los cuales tienen clonados los genes completos de las proteínas estructurales y no estructurales del Virus Dengue, fusionados al gen de Hemaglutinina.

#### *Microscopía avanzada de fluorescencia.*

Las células transfectadas o infectadas y las células control, fueron lavadas con tampón de citoesqueleto y fijadas con paraformaldehído, en condiciones de preservación de los elementos del citoesqueleto. Después fueron marcadas con anticuerpos específicos unidos a diferentes fluoróforos.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó por microscopía avanzada de fluorescencia (Olympus IX-81 con software análisis imagen Image Pro Plus de MediaCybernetics), el efecto de la inhibición de la HMG-CoA en células Vero infectadas con DENV-2 o que expresan las proteínas NS4B o Envoltura del virus, evaluando además su efecto e interacción con diferentes elementos del citoesqueleto.

Se observó pérdida del centro organizador de microtúbulos y remodelación de actina. Se observó disminución de la infección en células tratadas con Lovastatina. Igualmente se observaron diferentes patrones de expresión de las proteínas NS4B y Envoltura, las cuales difieren entre cada proteína y con respecto al control. Al tratar las células con Lovastatina, se observa un cambio en el patrón de expresión de éstas de manera dosis dependiente, alterando su distribución subcelular, inhibiéndose la secreción de NS4B de la célula, mientras que con la proteína Envoltura se observa una redistribución citosólica.

La acción antiviral de las estatinas podría explicarse en parte por su acción inhibitoria del tráfico de vesículas, mediante la inhibición de proteínas Rabs, afectando tanto los pasos de entrada y llegada hasta los sitios de replicación, así como la salida del virus desde éstos sitios hacia la membrana celular y salida por exocitosis. Es necesario realizar estudios complementarios que permitan confirmar estos hallazgos, para el mejor entendimiento de la Biología del Virus Dengue, y de ésta manera poder evaluar otros posible blancos para bloquear su ciclo replicativo.

La identificación de procesos y rutas celulares claves usados por el virus Dengue en su ciclo de vida, así como de los productos génicos virales implicados en éstos procesos, permitirá definir potenciales blancos celulares que afectan la replicación e infección exitosa del virus, con la mínima capacidad de escape debido a la alta tasa de mutación de su genoma RNA.

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET. Línea Biología Viral.

<sup>2</sup> Grupo de Neurociencia de Antioquia. Línea Neurobiología. Sede de Investigación Universitaria-SIU. Universidad de Antioquia

Correspondencia: Cellular and Molecular Neurobiology Viral Vector Core and Gene Therapy Neurosciences Group of antioquia. PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) Sede de Investigación Universitaria. SIU. Calle 62 # 52-59, Torre 2 piso 6. Laboratorio 632. E-mail: juanc.galegomez@gmail.com; milecuartas@gmail.com

## La infección con virus dengue disminuye la expresión de TLR4

Silvia Torres<sup>1</sup>, Juan C. Hernández<sup>1</sup>, Francisco Javier Díaz<sup>1</sup>, Silvio Urcuqui-Inchima<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

La infección por el virus Dengue (DENV) desencadena un amplio espectro de sintomatología clínica que va desde una fiebre indiferenciada (Dengue clásico), hasta manifestaciones severas y potencialmente fatales como el Dengue Hemorrágico y el síndrome de choque por Dengue (DH/SCD). La aparición del DH/SCD está asociada con un desbalance en la respuesta inmune, caracterizada por alta producción de citocinas/quimocinas, que favorecen el daño celular (endotelio), aumentando la permeabilidad vascular. Los mecanismos que inducen la cascada de citocinas en el DH/SCD, son controversiales, y el papel de la inmunidad innata en este proceso, en especial el de los receptores tipo Toll (TLR), no ha sido bien establecido. Los TLR participan activamente en el reconocimiento de ciertas moléculas presentes en los agentes patógenos y desencadenan vías de señalización, que conllevan a la expresión de citocinas proinflamatorias. Dadas las características del dengue, como los altos niveles de citocinas proinflamatorias, es posible que los TLR jueguen un papel fundamental en dichas alteraciones.

### OBJETIVO

Evaluar el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en monocitos (Mon), células dendríticas mieloides (mDC) y plasmacitoides (pDC) de pacientes con DENV en fase de viremia, de convalecencia y en controles sanos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de sangre venosa periférica de 11 individuos con infección confirmada por dengue y de 13 individuos control, se separan las células mononucleares por gradiente de densidad y se determinó por citometría de flujo el nivel de expresión de TLR2 y TLR4 en tres subpoblaciones celulares (Mon, pDC, mDC). Además, a partir de células mononucleares, se cuantificó el nivel de ARNm de los dos receptores por RT-PCR en tiempo real.

## RESULTADOS

Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la expresión de TLR4 en mDC y pDC obtenidas de los individuos infectados con DENV en fase de viremia, comparando con los niveles expresados en fase de convalecencia y con los niveles de expresión en los individuos control. Un resultado similar se observó a nivel de ARNm.

## CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Los resultados sugieren que el DENV es capaz de regular negativamente la expresión (proteína y ARNm) de TLR4 en CD, en la fase de viremia. Según nuestros resultados, dicho comportamiento solo se observa para el TLR4, ya que no se observó el mismo comportamiento para TLR2. Es probable que la disminución en la expresión de TLR4 esté relacionada con la presencia del virus. Sin embargo, es necesario profundizar en este tipo de estudios de tal manera que se pueda inferir además, si existe una relación directa entre los niveles de expresión de dicho receptor y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

<sup>1</sup>Grupo Inmunovirología - Universidad de Antioquia, Colombia.

Correspondencia: Calle 62 # 52-59, Laboratorio 532. Sede de Investigación de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Tel. 2196482. E-mail: mayitator@gmail.com

## Cuantificación relativa y absoluta del virus de la enfermedad de gumboro por medio RT – PCR en tiempo real en aves vacunadas

Javier Andrés Jaimes Olaya<sup>5,6</sup>,  
Víctor Julio Vera Alfonso<sup>1,7</sup>

## INTRODUCCIÓN

El virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV por su sigla en inglés), es el agente causal de una enfermedad inmunosupresiva severa en aves de producción, especialmente en edades jóvenes. Dada la amplia distribución del agente en nuestro medio a pesar de la vacunación, y al hecho de que algunos diagnósticos clínicos a nivel molecular realizados en el país, se encuentran muy relacionados con cepas vacunales, existe una creencia entre los avicultores de que la vacunación

es insuficiente para prevenir la enfermedad, y que por el contrario, esta puede revertir su patogenicidad e inducir la presentación de la enfermedad.

## OBJETIVO

Determinar la carga relativa y absoluta del IBDV, en animales vacunados y antenidos en condiciones semi – controladas, por medio de RT – PCR en tiempo real, y el efecto patógeno de esta vacunación sobre la bursa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se tomaron 72 pollos hembras de la estirpe Ross 308, las cuales fueron alojadas bajo condiciones de semi – aislamiento, y divididas en tres grupos experimentales. El primer grupo fue vacunado con el IBDV cepa Lukert los días 8 y 16 de vida; el grupo 2 con cepa Lukert al día 8 y cepa Winterfield 2512 al día 16; y el grupo 3 no fue vacunado y se constituyó en el grupo control. Se tomaron tejidos bursales cada 3 días durante los primeros 21 días de vida para ser analizadas por RT – PCR en tiempo real y por histopatología. Se realizó la cuantificación absoluta y relativa de la carga viral. La primera, se realizó en comparación a una curva patrón del virus; y la segunda, en comparación con un gen de expresión constitutiva (subunidad ribosomal 28S de Gallus gallus).

## RESULTADOS

Se encontró que la cantidad de virus presente en los animales posterior a la vacunación, no fue suficiente para ser detectada y cuantificada con la técnica de RT – PCR en tiempo real, lo cual se debe a la poca cantidad de virus presente en la vacuna, la cual solo puede ser detectada por esta técnica hasta una dilución de 1/100 (para el caso de vacunas para 1000 dosis). Al mismo tiempo, se comprobó que el efecto patógeno de la vacuna sobre la bursa es mínimo, y solo se presentó en forma leve luego de la vacunación con una cepa de tipo intermedia plus (cepa Winterfield 2512).

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo, permitieron demostrar que el efecto patógeno de la vacunación sobre las aves es mínimo, principalmente debido a la poca cantidad de virus que es administrada a los animales con la vacuna, al mismo tiempo de que se demostró que la técnica de RT – PCR en tiempo real, es adecuada para la detección del virus, solo cuando este se encuentra en concentraciones altas.

<sup>1</sup> Grupo de Microbiología y Epidemiología. Universidad Nacional de Colombia

<sup>1</sup> Vicerrectoría de Investigación y Transferencia, Universidad de La Salle

<sup>1</sup> Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia  
Correspondencia: Javier Andres Jaimes Olaya, Universidad de La Salle, Sede Chapinero. Carrera 5 # 59A-44. Edificio Hno. Justo Ramón, piso 7. Bogotá D.C. Colombia.  
E-mail: jajaimeso@lasalle.edu.co

## **Identificación del genoma del virus de bronquitis infecciosa aviar (VBI) en granjas avícolas de pollo de engorde con antecedentes de presencia de la enfermedad en el departamento de Cundinamarca.**

Diana Claudia Marcela Álvarez Espejo<sup>1</sup>,  
Víctor Julio Vera Alfonso<sup>1,2</sup>

### **INTRODUCCION**

El virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (VBI) es una entidad perteneciente al género *Coronavirus*, causante de una enfermedad altamente contagiosa que ocasiona grandes pérdidas económicas en sistemas de producción de pollo de engorde representadas por la disminución en la ganancia de peso, eficiencia alimenticia, altas tasas de morbilidad, decomisos en planta de beneficio y costos por vacunaciones. Actualmente, es una de las principales enfermedades presentes en las granjas avícolas de Cundinamarca con un número incierto de cepas diferentes del serotipo vacunal, conllevando a una baja protección inmune de las aves y demostrando la alta variabilidad del virus. En Colombia, aunque solo se ha realizado una investigación donde se detectaron y caracterizaron cepas del VBI en el 2003, se desconoce la situación actual de la enfermedad en el país.

### **OBJETIVO**

Identificar el VBI mediante el uso de la prueba RT-PCR, amplificando el gen S1 del VBI a partir de muestras de tráquea, pulmón, riñón y tonsila cecal de aves con sospecha de infección viral, las cuales fueron provenientes de cinco granjas de los municipios de

Fusagasuga, Silvania y Arbelaez (Cundinamarca), regiones donde se concentra un gran número de granjas avícolas en el país.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los sistemas de producción seleccionados presentaron historia, resultados serológicos y lesiones histopatológicas compatibles con la enfermedad. Estas granjas demostraron similitud en las condiciones de manejo y alimentación, recibiendo una sola vacuna contra el VBI el primer día de edad, en la incubadora por aspersión. Se tomaron cinco aves de cada granja al día 7, 14, 28 y al final del ciclo (aproximadamente los días 39 – 45), para un total de 100 aves. Las aves fueron examinadas a través de un diagnóstico integral compuesto del examen clínico y necropsia. Empleando la técnica RT-PCR, se amplificó la región hipervariable de la proteína S1 del virus de VBI a partir de las muestras tomadas a la necropsia. Los productos se visualizaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se observó el amplificado de 1720 pares de bases.

### **RESULTADOS**

Se identificó el agente viral en dos de las cinco granjas seleccionadas, ubicadas en el municipio de Silvania, en muestras de tráquea y pulmón de los días 14, 28 de edad. No se detectó el virus en las muestras de riñón y tonsila cecal de las aves muestreadas, así como no se identificó el agente viral en las granjas ubicadas en los municipios de Fusagasuga y Arbelaez.

### **CONCLUSIONES**

Se confirmó la presencia de una infección viral aguda ya que se detectó el genoma viral en muestras de tráquea y pulmón en los días 14 y 28, en el 40% de las granjas seleccionadas. La ausencia de detección del VBI en muestras de tonsila cecal y riñón, descarta la presencia de una enfermedad crónica en las aves muestreadas y reitera la ausencia de serotipos nefropatogénicos en Cundinamarca. Con el fin de caracterizar las cepas del virus detectadas, se realizará RLFP y secuenciación de nucleótidos.

<sup>1</sup> Laboratorio de Virología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

<sup>2</sup> Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Correspondencia: Carrera 68G # 9C-97 T2 Apt 706. Bogotá. Cundinamarca. E-mail: dcalvareze@unal.edu.co

## Serotipificación de virus dengue por PCR en tiempo real

Marlén Martínez-Gutiérrez<sup>1</sup>, Carolina Quintero-Gil C<sup>1</sup>, Jeanette Prada-Arismendy<sup>2</sup>, Jaime E. Castellanos<sup>2</sup>, Doris Salgado<sup>3</sup>, Marta Ospina<sup>4</sup>, Jorge E. Osorio<sup>1,5</sup>.

### INTRODUCCION

Se postula que hay una relación directa entre la carga viral y la severidad de las enfermedades producidas por el Virus Dengue (DENV), por lo que es necesario mejorar las técnicas diagnósticas que permitan la identificación y cuantificación rápida del virus. Por lo tanto nuestro objetivo fue adecuar una técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR) para la cuantificación de DENV en sobrenadantes de cultivo celular y sueros de pacientes.

### METODOLOGÍA

Se hizo extracción de RNA a partir de sueros de pacientes del Huila y de Antioquia y de sobrenadantes de células infectadas con cepas de Referencia de DENV (1-4), los cuales sirvieron como control de la técnica. Posteriormente se hizo RT-PCR. Los amplificadores fueron verificados por electroforesis y las bandas fueron purificadas y clonadas para la construcción de los plásmidos correspondientes para la cuantificación qRT-PCR usando SYBR-Green. Los controles positivos fueron sobrenadantes infectados titulados por ensayo de plaqueo y monocapas procesadas por inmunofluorescencia. En total se procesaron 21 sueros de pacientes.

### RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Se encontró marcaje específico para cada virus de referencia (DENV-1 a -4) por ensayo de inmunofluorescencia. Los títulos de los sobrenadantes recolectados, concuerdan con la carga viral obtenida por el ensayo de qRT-PCR. Los sueros negativos mostraron CT mayores a 30, mientras los sueros positivos presentaron CT entre 10 y 25, de acuerdo a la carga viral. El potencial de la técnica como herramienta diagnóstica se evaluó en sueros de pacientes de Antioquia y del Huila, con cuadros clínicos sospechosos de Dengue. En total se evaluaron 21 sueros, logrando identificar cada uno de los 4 serotipos en ellos. En conclusión, la PCR cuantitativa utilizando primers específicos reportados previamente, es específica para cada uno de los 4 serotipos virales y permite la cuantificación de virus en sobrenadantes y sueros.

1. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET- Universidad de Antioquia. Medellín. Antioquia. mmartinezg76@yahoo.com
2. Instituto de Virología. Universidad El Bosque. Bogotá D.C.
3. Universidad Surcolombiana. Neiva. Huila.
4. Laboratorio Departamental de Salud de Antioquia. Medellín. Antioquia
5. Department of Pathobiological Sciences. University of Wisconsin-Madison. USA

Correspondencia: Programa de Estudio y control de Enfermedades Tropicales - PECET. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. Calle 62 # 52-59. Torre 2 piso 6. Lab 632. E-mail: mmartinezg@pecet-colombia.org

## Diagnóstico, serotipificación y cuantificación de la infección por dengue virus por PCR en tiempo real usando un sólo par de primers

Silvia Torres<sup>1</sup>, Juan Guillermo Betancur<sup>1</sup>, Juan Carlos Hernández<sup>1</sup>, Francisco Javier Díaz<sup>1</sup>, Diana Marcela Giraldo<sup>1</sup>, Silvio Urcuqui-Inchima<sup>1</sup>

### INTRODUCCIÓN

Debido a la diferencia en la virulencia y en las complicaciones asociadas con los cuatro serotipos existentes del virus dengue, existe la necesidad de poder diagnosticar, serotipificar y cuantificar de forma rápida y confiable el tipo de dengue causante de la enfermedad; esto permitirá suministrar un tratamiento adecuado al paciente. Existen metodologías que permiten serotipificar el virus por PCR, pero se necesitan ensayos independientes para cada uno de los serotipos, ya que requieren primers específicos para cada uno de ellos.

### OBJETIVO

Estandarizar una metodología que permita diagnosticar, cuantificar y serotipificar la infección por virus dengue; además que permita el diagnóstico de la infección a partir de suero de pacientes en fase de viremia.

### MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de aislados de referencia y locales de virus dengue, se purificó ARN total y se sintetizó ADNc. Luego se estandarizaron las condiciones para amplificar

por PCR en tiempo real y utilizando SYBR Green y un solo par de primers, una secuencia de alrededor de 95pb de la región no codificante 3' de los 4 serotipos del virus. La técnica se basa en el análisis de la temperatura "melting" del fragmento amplificado, que es específica para cada uno de los serotipos (Chutinimitkul et al, 2005). Usando diluciones de un plásmido que contiene la 3'UTR de cada uno de los serotipos se construyen curvas de calibración, que permiten cuantificar el ARN viral presente en cada muestra a partir del valor CT. Se establece la correspondencia entre la cuantificación y el título obtenido por Unidades Formadoras de Placa. Una vez estandarizada la técnica, se utiliza para muestras obtenidas directamente de pacientes en fase de viremia, lo que permitirá determinar su efectividad como herramienta de diagnóstico.

## RESULTADOS

La técnica permite serotipificar DENV2 y DENV3, cuyas temperaturas "melting" son de 80.1°C y 82°C respectivamente y coinciden con las reportadas. Sin embargo, se observa según el artículo de referencia que la temperatura de DENV1 corresponde a la de DENV4 y viceversa. Por tanto, se está realizando nuevos ensayos que nos permitan determinar si dicho comportamiento es consecuencia de un error o, en realidad es el patrón típico para esos dos serotipos en la región o a una diferencia en la región amplificada entre las cepas reportadas y las nuestras. Igualmente se está realizando los ensayos de cuantificación, de tal manera que se puedan comparar con los obtenidos por plaqueo, para DENV2, que corresponde a 2.7 X10<sup>4</sup> UFP/ mL.

## CONCLUSIONES

La técnica permite diagnosticar y serotipificar DENV2 y DENV3, usando solo un par de primers. Estamos tratando de obtener el mismo resultado para los otros dos serotipos. Se realizarán los ensayos para determinar el título viral una vez se construyan las curvas de calibración y se establezca la correspondencia entre la cantidad de ARN presente en la muestra y el título viral obtenido por plaqueo. Se espera poder extrapolar los resultados obtenidos in vitro a muestras obtenidas de pacientes en fase de viremia, poder diagnosticar, serotipificar y cuantificar el virus causante de la enfermedad en unas pocas horas.

1.Grupo Inmunovirología - Universidad de Antioquia, Colombia.

Correspondencia: Cra 53 # 61-30. Lab 532. Sede de Investigación Universitaria, Medellín. Colombia.

E-mail: juguibe@gmail.com

# Detección serológica del herpesvirus equino (EHV 1 Y 4) en caballos de trabajo procedentes de los llanos orientales

Edwin Camilo Tequia<sup>1,3</sup>, Víctor Julio Vera<sup>2,3</sup>, Jairo Jaime<sup>2,3</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La Rinoneumonitis Equina es producida por el EHV 1 y 4. La enfermedad es endémica en Norteamérica, Europa y Australia, originando pérdidas económicas como consecuencia de los brotes ocasionando enfermedad respiratoria aguda, abortos, muerte neonatal y recientemente se ha establecido una cepa del EHV1 capaz de causar mieloencefalopatía. En Colombia en el 2001 se presentó un brote epidémico de abortos en una explotación equina con previa importación de ejemplares donde se logró realizar el aislamiento viral. En un trabajo realizado durante el 2007 en los departamentos de Antioquia y Meta se estableció una alta seroprevalencia para el EHV4 en equinos destinados para el coleo y la producción intensiva.

## OBJETIVO

El presente trabajo tiene por objeto determinar la seroprevalencia del EHV 1 y 4 en equinos provenientes de los municipios Acacias, Castilla la Nueva, Cumaral, Granada, San Martín y Villavicencio (Meta), con el fin de establecer la respuesta inmune al virus ocasionada por la infección natural.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se muestrearon 100 animales provenientes de Acacias, Castilla la Nueva, Cumaral, Granada, San Martín y Villavicencio (Meta) cuya actividad zootécnica es la vaquería. A cada uno de los animales se muestreó por punción de la vena yugular usando el sistema Vacutainer® en tubos sin anticoagulante. Los sueros fueron separados en el laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y congelados a -20°C hasta el momento de procesarlos. Se realizó una prueba de Elisa indirecta para la detección de anticuerpos contra los dos virus (EHV 1 y 4) usando el kit para diagnóstico SVANOVIR® EHV1/EHV4-Ab

ELISA, el cual permite detectar anticuerpos contra la glicoproteína G (gG) de EHV1 y EHV4 en muestras de suero, la prueba fue leída a través del Lector Stat Fax® 3200 Microplate Reader.

## RESULTADOS

De los 100 animales muestreados el, 82% fueron positivos para la presencia de anticuerpos contra el EHV4 y tan solo el 6% para infección mixta con ambos virus. Del total de los animales positivos a EHV4, el 66.6% correspondió a hembras y el 33.4% machos; para los animales positivos a HV1, 5 de los 6 animales eran hembras. La seroprevalencia para el EHV4 por grupo etáreo fue de 85.19% para adultos y 14.81% para animales menores a un año de edad.

## CONCLUSIONES.

La prevalencia obtenida en el presente estudio es comparable a los reportes previos en regiones en la que la infección por EHV4 y EHV1 es enzoótica y para el EHV4 esta usualmente establecida en adultos. La prevalencia para el virus indica la dispersión de la enfermedad más allá de los equinos de pista y competencia evaluados previamente en el país. La reactivación viral ocasionada por inmunosupresión en animales seropositivos constituye la principal fuente de dispersión del virus a animales sanos. El presente trabajo hace parte de la identificación del virus por técnicas moleculares y al intento de aislamiento viral. Aproximaciones a la enfermedad como la encontrada en el presente estudio, son de fácil interpretación donde la vacunación no esta establecida.

1 Médico veterinario, estudiante de Maestría; ectequiar@unal.edu.co

2 Médico Veterinario, MSc, PhD.

3 Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Correspondencia: Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. E-mail: ectequiar@unal.edu.co; vjveraa@unal.edu.co; jjaimec@unal.edu.co

## Los virus como indicadores de contaminación del agua

Andrey Payán González. MSc. PhD<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la OMS la sexta parte de la población mundial no dispone de agua segura de suministro, lo que favorece que las infecciones transmitidas por este elemento sean de las más prevalentes entre la población. La reciente entrada en vigencia de la Nueva Ley de Aguas Subterráneas en EEUU pone de manifiesto en el creciente interés que los organismos encargados de vigilar la salud de las comunidades asignan al monitoreo específico los virus en el agua. De las diferentes fuentes de abastecimiento de agua que se emplean en el mundo las más expuestas a la contaminación fecal tanto de origen puntual como difuso son las aguas superficiales. Este tipo de contaminación acarrea amenazas serias para la salud de las comunidades y se reconoce como la principal causa de síndromes gastroentéricos

debidos a agentes infecciosos. De entre todas las posibles causas de diarreas infecciosas se reconoce que los virus juegan un papel predominante alrededor del mundo, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo. Los virus Norwalk y Norwalk-Like virus son reconocidos como la principal causa de enfermedades transmitidas por agua a nivel mundial.

Los organismos encargados de la vigilancia de la calidad del agua con destino al consumo humano se enfrentan a la difícil situación de escoger la mejor forma de determinar la presencia de virus en este recurso. En términos generales, actualmente, se reconoce que es mejor estimar la calidad microbiológica del agua a través de indicadores que por la determinación directa de la presencia de los patógenos. No obstante los métodos aplicados a muestras ambientales para la determinación de la presencia virus de procedencia fecal en aguas se han topado con varias inconvenientes. Entre estos destacan que los indicadores bacterianos usualmente empleados para estimar la contaminación fecal del líquido no siempre se corresponden con la presencia concomitante de virus en las mismas muestras.

Debido a lo anterior se sigue investigando acerca de la mejor forma de detección de los virus patógenos en agua. En la mayoría de los casos las técnicas apuntan a la detección de microorganismo por métodos de cultivo o por métodos moleculares.

Sin embargo hasta la fecha no se dispone una metodología eficaz, que pueda ser aplicada fácilmente, de bajo costo y que permita el monitoreo de la presencia de virus potencialmente patógenos en los diferentes

tipos de agua. La adopción de los bacteriófagos como modelos de virus entéricos en agua en varios países se muestra como una herramienta prometedora, ya que aprovecha características comunes que comparten los dos microorganismos y que permiten estimar más cercanamente el riesgo de infección viral por esta vía. Aunque estudios preliminares muestran una buena correlación que permitiría el uso de ciertos tipos de fagos como indicadores de la presencia de virus entéricos en aguas, aún hace falta más desarrollo en esta área, principalmente en la estandarización de las técnicas, la búsqueda de nuevos fagos y de modelos predictivos.

1 Escuela de Bacteriología. Universidad del Valle, Cali.  
Correspondencia: Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Sede de San Fernando. Cali. Colombia.

E-mail: anpayan@hotmail.com

## **Detección en suero de la proteína viral Ns1 para la confirmación por laboratorio del dengue en etapa temprana**

Sergio Yebrail Gómez<sup>1</sup>, Luis Carlos Orozco<sup>2</sup>, Rosa Margarita Gélvez<sup>1</sup>, Raquel Ocazionez<sup>1</sup>.

### **OBJETIVO**

Comparar la frecuencia a la que se confirma el dengue en casos febriles detectando NS1 y anticuerpos IgM en suero de fase aguda y determinar si la misma varía en relación con la presencia de anticuerpos IgG anti-dengue y el serotipo del virus.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Mediante un muestreo retrospectivo se incluyeron 151 sueros de pacientes con dengue confirmado por aislamiento del virus y que fueron colectados entre el 1º. y 5º. día de síntomas. El virus se aisló en células de mosquito (C6/36) y se tipificó por PCR. El serotipo-1, -2, -3 y -4 se identificó en 27, 52, 64 y 8 de los aislados, respectivamente. Los sueros se procesaron simultáneamente para buscar NS1 y anticuerpos anti-dengue IgM e IgG usando los estuches ELISA-

NS1 (PANBIO E-DEN1P), MAC-ELISA (PANBIO E-DEN1M) y ELISA-IgG (PANBIO E-DEN1G), respectivamente. La presencia de anticuerpos IgG se interpretó como infección secundaria. Como controles se incluyeron 25 sueros de casos febriles en quienes el dengue se descartó por serología negativa en suero pareado e intento no-exitoso de aislamiento del virus.

### **RESULTADOS**

La proteína NS1 se detectó en 85% (IC 95%, 78.2 – 90.4) de casos con aislamiento del virus mientras que los anticuerpos IgM en 43.8% (IC 95%, 35.6 – 52.3). Los valores ROC fueron 0.90 (IC95% 0.85-0.95) y 0.69 (IC95% 0.64-0.75) con ELISA-NS1 y MAC-ELISA, respectivamente y las diferencias fueron significativas ( $P < 0.001$ ). Anticuerpos IgG anti-dengue no se detectaron en 89.4%, 78.5%, 55.6% y 12.5% de sueros de casos infectados con el serotipo-1, -3, -2 y -4, respectivamente. La NS1 se detectó con mayor frecuencia en sueros con resultado negativo para anticuerpos IgG que con resultado positivo: 91.5% versus 64% ( $p = 0.0000$  .2 exacto). La frecuencia a la que se detectó NS1 varió dependiendo del virus, en sueros con el serotipo-1, -2, -3 y -4 fue 81.5%, 79.6%, 95.2% y 50% ( $p = 0.0000$  .2 exacto).

### **CONCLUSIONES**

La presencia sérica de la proteína NS1 confirmó dengue en 85% de los casos usando una única muestra de suero colectada durante la fase febril. 2) la frecuencia a la cual se confirmó dengue por MAC-ELISA se incrementó 1.9 veces cuando se reemplazó por ELISA-NS1. 3) la sensibilidad del ELISA-NS1 fue mayor en infecciones primarias y por ende en infectados con los serotipos 1 y 3.

**Fuente de Financiamiento:** Universidad Industrial de Santander proyecto # 5636-2007 y parcialmente por la Gobernación de Santander, Secretaría de Salud, proyecto # 2007-068-000-0070.

1. Universidad Industrial de Santander. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales – CINTROP.
2. Centro de Investigaciones Epidemiológicas. Escuela de Enfermería

Correspondencia: Laboratorio de Arbovirus. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguara. Km2 Autopista a Piedecuesta. E-mail: raqueoca@hotmail.com