

EMANUELA AVELAR SILVA COSTA

Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adele Caterino-de-Araujo

SÃO PAULO

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação - Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

© Reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Costa, Emanuela Avelar Silva

Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 / Emanuela Avelar Silva Costa – São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Adele Caterino-de-Araujo

1. Vírus 1 linfotrópico T humano; 2. Vírus 2 linfotrópico T humano; 3. Técnicas imunoenzimáticas; 4. *Western Blotting*; 5. Reação em cadeia da polimerase; 6. PCR em tempo real.

SES/CCD/CD-238/10

***Trabalho realizado no Centro de
Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de
São Paulo/SP da Coordenadoria de
Controle de Doenças - Secretaria de
Estado de Saúde de São Paulo.***

Apoio Financeiro:

Instituto Adolfo Lutz, Projeto # 33/2007

CNPq Universal # 481040/2007-2

Bolsa PD CNPq # 303328/2009-6

Bolsa Mestrado CAPES



*“Se não houve frutos...
Valeu a beleza das flores...”*

*Se não houve flores...
Valeu a sombra das folhas...”*

*Se não houve folhas...
Valeu a intenção das sementes...”*

(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA



À Dr^a Adele Caterino-de-Araujo com toda a minha admiração...

*“... valeu a intenção das **suas** sementes...”*

AGRADECIMENTOS

À Deus...

Agradeço ao Criador, meu grande Mestre, por essa conquista, pelo dom da vida e por ter nos abençoado com a inteligência.

À Andrey Guimarães Sacramento...

Pela fonte inesgotável de amor, companheirismo, paciência e profissionalismo. Pode ter certeza que grande parte da Mulher que hoje eu sou, devo a você. Obrigado pela confiança incondicional e pelas infindáveis noites que virou comigo em meio a tantos papers e xícaras de café. Você, mais do que ninguém, sabe o quanto é essencial para mim.

Aos meus pais, Socorro Avelar e Rosevaldo Costa...

Minha mãe... minha vida... meu pai... meu herói... Tudo que fiz e faço, é por vocês... é para vocês... Obrigado pela educação, minha maior herança... pelos valores, minhas maiores relíquias... por meus irmãos, meu maior laço com vocês. Perdoem a minha ausência, mas não podia deixar para vocês, a responsabilidade de buscar a minha felicidade. Espero tão logo, estar sempre presente e me dedicar a conhecê-los mais.

Aos meus irmãos, Maria Emília e Leandro...

Nestes 10 anos em que não convivo com vocês aprendi que: o tempo passa, a vida acontece, a distância separa... mas o amor entre irmãos, deve ser o mais incondicional possível... vocês são a maior “ponte” com o meu passado e possivelmente, os que vão me apoiar sempre... Hoje, consigo estimar o quanto são fundamentais em minha vida.

À minha eterna orientadora, Dr^a Adele...

Redigir uma Dissertação de Mestrado... um desafio! Redigi-la como aluna da Dr^a Adele... um prazer! Aprendi... aprendi muito... Cresci... cresci muito... Dr^a Adele me mostrou o “Mundo da Ciência”, do fazer e desfazer... do fazer e refazer... do incansável ato de pesquisar... investigar... justificar... e ler... e ler... e ler, para enfim, escrever! Ensinou-me a buscar respostas... e não à reproduzir as prontas... mostrou-me que sou capaz, mesmo com todas as minhas limitações. Com uma paciência infindável,

literalmente, pegou em minha mão e me conduziu para muitas descobertas e aprendizados! É isso que um Orientador deve ser capaz: de lapidar os seus alunos. Adele, muito obrigado.

*E em especial, agradeço ao “**Carlinhos**” pela dedicação, compreensão e por fazer da Adele, esta grande Mulher... “À sombra de uma grande Mulher, sempre existe um grande Homem”.*

Aos meus amigos...

*Sei que amigos vêm e vão... mas nunca abri mão de poucos e bons... À todos que me incentivaram e estiveram presentes em minha jornada, agradeço. Em especial, à **Mariana Cavalcheiro Magri** pelo exemplo profissional, pela dedicação em nossos ensaios científicos e por todo apoio concedido para que concluíssemos este trabalho com êxito! Levarei para sempre o seu exemplo e a minha admiração por você! À **Artemir Coelho de Brito**, pelo constante incentivo, confiança e exemplo, pois assim como você, pretendo alcançar a tal sonhada meteórica carreira científica! Obrigado amigos!*

Aos membros da Banca de Qualificação Dr^a Kioko Takei, Dr^a Rosângela Rodrigues e Dr. José Eduardo Levi pelas relevantes sugestões que foram acatadas.

Ao Prof. Dr. Luigi Chieco-Bianchi, Pró-Reitor da Universidade de Pádua e ao Prof. Dr. Umberto Bertazzoni, Diretor do Departamento Materno-Infantil de Biologia e Genética da Universidade de Verona, exemplos de competência e humildade. Aos pesquisadores Maria Luiza Calabrò e Vincenzo Ciminale, do Instituto de Oncologia da Universidade de Pádua, Itália por terem gentilmente cedido as linhagens celulares utilizadas no presente trabalho.

Ao Laboratório de Sorologia para a infecção por HTLV-1/2, sob responsabilidade da Dr^a Elizabeth de los Santos-Fortuna, ao Laboratório de Meningites Bacterianas, sob responsabilidade do Dr. Cláudio Tavares Sacchi, e aos profissionais do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo (PPG/CCD/SES).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Costa, E A S - Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2

RESUMO

Em vista das dificuldades encontradas no diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo, foi proposto o presente estudo que objetivou avaliar o valor do *cut-off* dos testes de triagem sorológica e os algoritmos de testes laboratoriais, dando ênfase ao emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR) como teste confirmatório. Do total de 3.271 amostras de sangue provenientes da rotina diagnóstica dos anos de 1998 a 2010: (a) 2.312 amostras de soro (1998-2006) foram empregadas para estabelecer o melhor valor de *cut-off* para os ensaios imunoenzimáticos (EIAs) usando a análise ROC (*receiving operating characteristics*); (b) 313 amostras de sangue (2009) foram analisadas por algoritmo de duas coletas seqüências de sangue; (c) 73/959 amostras de sangue reagentes na triagem sorológica (2007-2010) foram empregadas no estudo comparativo de sensibilidade e custo dos testes confirmatórios de *Western blot* (WB), PCR convencional (*tax* e *pol*) e PCR em tempo real (*pol*). As PCRs foram otimizadas usando DNA extraído de linhagens celulares infectadas por HTLV-1 (C91-PL) e por HTLV-2 (BBF) e realizada pesquisa de gene da albumina humana como controle endógeno. Os resultados da análise ROC mostraram que um ajuste no valor do *cut-off* dos EIAs de 3ª geração aumentou a especificidade desses ensaios em 7,8%, sem alterar significativamente a sua sensibilidade. O algoritmo de coleta seqüencial de sangue se mostrou inadequado sendo mais apropriada a coleta única em tubo contendo anticoagulante. Os resultados do ensaio confirmatório de WB mostraram que este foi mais sensível (90,56%) do que a PCR convencional (77,36%) e a PCR em tempo real (79,25%), provavelmente pela pequena carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 presente no sangue, principalmente de

portadores assintomáticos. Todavia, as técnicas de PCR se mostraram úteis na elucidação de amostras com padrão indeterminado à análise pelo WB, sendo os ensaios sorológicos e moleculares complementares. Concluindo, em vista da PCR em tempo real ser um teste rápido, seguro, de menor custo e de fácil execução, ele pode ser aplicado como primeiro teste confirmatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 seguido do WB.

Palavras-Chave: vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1); HTLV-2; ensaio imunoenzimático (EIA); *Western blot* (WB); reação em cadeia da polimerase (PCR); PCR em tempo real.

Costa, E A S - Use of the real-time polymerase chain reaction in the HTLV-1 and HTLV-2 infections diagnostic testing algorithm

ABSTRACT

Taking into account the difficulties in diagnosing the human T-cell lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Instituto Adolfo Lutz of São Paulo, the present study was conducted aiming at evaluating the cut-off values of screening enzyme immunoassays (EIAs) and the tests algorithms, emphasizing the use of polymerase chain reaction (PCR) as confirmatory assay. Of 3,271 blood samples routinely analyzed from 1998 to 2010: (a) 2,312 serum samples (1998-2006) were assessed for the best cut-off value by using the receiving operating characteristics analyses (ROC); (b) 313 blood samples (2009) were tested following the algorithm which employs two sequential blood collection, and (c) 73/959 blood samples (2007-2010) showing reactive results on screening testing were employed for comparative analysis of serologic (Western blot – WB) and molecular confirmatory assays [PCR (*tax* and *pol*) and real time PCR (*pol*)]. The PCRs were optimized using the cells lines infected with HTLV-1 (C91-PL) and HTLV-2 (BBF), and the human albumin gene. The ROC analysis showed that an adjustment of the cut-off value in the third generation EIAs increased their specificity in 7.8%. The use of the sequential blood collection algorithm for serological diagnosis was completely inefficient and a unique blood collection in an anticoagulant-containing tube seems to be the most appropriate. The WB confirmatory assay resulted to be more sensitive (90.56%) than the standard PCRs (77.36%) and the real-time PCR (79.25%), probably owing to the low HTLV-1 and HTLV-2 proviral load in asymptomatic carriers' blood. However, the PCRs were able in elucidating the samples with indeterminate WB profile, thereby standing the serologic and molecular assays as complementary tests. In conclusion, because of the low cost, rapidity, reliability and easiness to perform, the real-time PCR could be used as the first confirmatory assay

for performing the HTLV-1 and HTLV-2 diagnosis, followed by the WB technique.

Key words: human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); HTLV-2; enzyme immunoassay (EIA); Western blot (WB); polymerase chain reaction (PCR); real time PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> - Síndrome da imunodeficiência adquirida
AE-SUS	Ambulatórios de Especialidades do Sistema Único de Saúde
ATL	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> - Leucemia linfoma de células T do adulto
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos
CRTA	Centro de Referência e Treinamento em AIDS
Cut-off	Ponto de corte de reação imunoenzimática que define caso positivo
Ct	<i>cycle threshold</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
EIA	<i>Enzyme Immune Assay</i> - Ensaio imunoenzimático
FAM	fluoróforo <i>6-carboxyfluorescein</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> - Centro de Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos
HBZ	<i>HTLV-1 basic leucine zipper factor</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus type I</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1
HTLV-2	<i>Human T-lymphotropic virus type II</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFI	Imunofluorescência indireta

INNO-LIA	Imunoensaio de linha
KDa	<i>Kilo Daltons</i>
Kit	Conjunto de reagentes
MS	Ministério da Saúde - Brasil
n	Número de amostras
n-PCR	<i>nested PCR</i>
NFQ	<i>Non fluorescent quencher</i>
NTC	<i>no template control</i>
OPD	o-fenilenodiamina
ORF	<i>Open reading frame</i> - Regiões abertas para leitura
PA	Teste de aglutinação de partículas
pb	Pares de bases
PBL	<i>Peripheral blood leucocytes</i> - leucócitos do sangue periférico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	<i>PCR - Restriction Fragments Length Polymorphism</i> Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição enzimática em produtos de PCR
RIPA	Radioimunoprecipitação
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiving operating characteristics</i>
SES-SP	Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
TMB	Tetrametilbenzidina
TSP/HAM	<i>Tropical Spastic Paraparesis / HTLV-I-Associated Myelopathy</i> - Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia associada ao HTLV-1
UDI	Usuário de drogas injetáveis
vs	Versus
WB	<i>Western blot</i>

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Prevalência de infecção por HTLV-1 reportadas em várias populações e em diversas regiões do mundo	8
Quadro 2: Prevalência de infecção por HTLV-1/2 reportadas em alguns estudos conduzidos com diferentes populações das várias regiões do Brasil	10
Tabela 1: Número de amostras de soro/plasma encaminhadas ao IAL para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 com resultados reagentes e/ou discordantes nos EIAs e que foram submetidas à confirmação sorológica pela técnica de WB (2007 a 2010)	23
Quadro 3: <i>Primers</i> e sondas utilizadas nas reações de PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e PCR em tempo real (<i>pol</i>) para a detecção de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 e da albumina humana em leucócitos de sangue periférico (PBL)	25
Quadro 4: Protocolos adotados nas reações de PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e PCR em tempo real (<i>pol</i>) para a identificação dos segmentos genômicos de HTLV-1 e HTLV-2 em leucócitos do sangue periférico (PBL)	26
Tabela 2: Sensibilidade das técnicas de <i>n</i> -PCR e PCR em tempo real na amplificação de segmentos do genoma proviral de HTLV-1/2 (regiões <i>tax</i> e <i>pol</i>) presentes em linhagens C91/PL (HTLV-1) e BBF (HTLV-2) e de segmento da albumina humana (controle endógeno) ...	32
Tabela 3: Resultados obtidos pelas técnicas de PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e em tempo real (<i>pol</i>) empregadas no diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em 73 amostras previamente submetidas à confirmação sorológica pela técnica de WB (2007 a 2010)	41

Tabela 4: Valores de Ct obtidos nas 42 amostras HTLV-soropositivas da rotina diagnóstica do IAL ao serem submetidas à PCR em tempo real (<i>pol</i>) para confirmação e tipagem molecular	44
Tabela 5: Resultados comparativos das 16 amostras positivas para HTLV-1/2 que apresentaram resultados discordantes entre o WB e/ou a PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e/ou a PCR em tempo real (<i>pol</i>)	47
Tabela 6: Distribuição do número de amostras positivas (n=53) e indeterminadas (n=16) para HTLV-1/2, segundo faixa etária e gênero dos pacientes	49
Tabela 7: Comparação das características operacionais e dos indicadores de desempenho dos testes confirmatórios de WB, PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e PCR em tempo real (<i>pol</i>) empregados no diagnóstico confirmatório da infecção por HTLV-1/2	50
Tabela 8: Levantamento de custos de ensaios confirmatórios adotando o Algoritmo IAL 2007 (2ª etapa) e o Algoritmo IAL 2010 com 73 amostras de sangue analisadas	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da partícula viral do HTLV-1/2	3
Figura 2: Representação esquemática do genoma do HTLV	3
Figura 3: Epidemiologia global do HTLV-1/2	7
Figura 4: Prevalências de infecção por HTLV-1/2 reportadas no Brasil	9
Figura 5: Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2007	17
Figura 6: Representação esquemática do cálculo do valor de <i>cut-off</i> (ponto de corte) que discrimina casos HTLV-1/2 verdadeiramente positivos dos HTLV-1/2 negativos e análise ROC	20
Figura 7: Padrão de reatividade do <i>Western blot</i> (HTLV Blot 2.4, Genelabs), segundo o fabricante Genelabs Diagnostics® (Singapore)	21
Figura 8: Valores de DO/ <i>Cut-off</i> dos EIAs de 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a gerações de acordo com os resultados do WB	29
Figura 9: Produtos de amplificação da <i>n</i> -PCR (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e da PCR em tempo real (<i>pol</i>) obtidos a partir de diluições seriadas de DNA da linhagem celular infectada com HTLV-1 (C91/PL), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	33
Figura 10: Número de ciclos (<i>cycle threshold</i>) necessários para resultar numa PCR em tempo real <i>pol</i> positiva em amostras de DNA obtidas de linhagem celular infectada por HTLV-1 (C91/PL), usando diluições seriadas de DNA (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg)	34

Figura 11: Produtos de amplificação da <i>n</i> -PCR (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e da PCR em tempo real (<i>pol</i>) obtidos a partir de diluições seriadas de DNA da linhagem celular infectada com HTLV-2 (BBF), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	35
Figura 12: Número de ciclos (<i>cycle threshold</i>) necessários para resultar numa PCR em tempo real <i>pol</i> positiva em amostras de DNA obtidas de linhagem celular infectada por HTLV-2 (BBF), usando diluições seriadas de DNA (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg)	36
Figura 13: Produtos de amplificação da <i>n</i> -PCR (<i>pol</i>) e da PCR em tempo real (<i>pol</i>) obtidos a partir de diluições seriadas de DNA da amostra CP-2, submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	37
Figura 14: Número de ciclos (<i>cycle threshold</i>) necessários para resultar numa PCR em tempo real <i>pol</i> positiva, usando diluições seriadas de DNA da amostra CP-2 (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg)	38
Figura 15: Produtos de amplificação da PCR em tempo real para albumina humana obtidos a partir de diluições seriadas de DNA de amostra negativa para HTLV-1/2 (CN-1), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	39
Figura 16: Número de ciclos (<i>cycle threshold</i>) necessários para resultar numa PCR em tempo real positiva para o gene da albumina humana em amostra HTLV-soronegativa, usando diluições seriadas de DNA (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg)	39
Figura 17: Curvas de valores de <i>Ct</i> obtidas pela PCR em tempo real a partir de diluições seriadas dos DNAs extraídos das linhagens celulares C91/PL e BBF e de amostras controle positivo para HTLV-2 (CP-2) e endógeno de reação (albumina, CN-1)	40

Figura 18: Produtos de amplificação da <i>n</i> -PCR (<i>tax</i> e <i>pol</i>) obtidos em amostras representativas da rotina diagnóstica do IAL (2007 a 2010), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	42
Figura 19: Amostras representativas do padrão eletroforético da PCR-RFLP de produtos de amplificação da <i>n</i> -PCR (<i>tax</i>) antes e após a digestão pela enzima <i>Taq</i> I em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio	43
Figura 20: Curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real (<i>pol</i> e albumina) em amostras representativas positivas e negativas para HTLV-1/2 encaminhadas ao IAL (2007 a 2010)	45
Figura 21: Resultados e perfis de bandas obtidos pelo WB em amostras submetidas às PCRs convencionais (<i>tax</i> e <i>pol</i>) e em tempo real (<i>pol</i>) que obtiveram resultados discordantes entre os testes confirmatórios	46
Figura 22: Representação esquemática da síntese dos resultados obtidos pelos testes confirmatórios (sorológico e moleculares) empregados no diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em 73 amostras de sangue encaminhadas ao IAL para análise (2007 a 2010)	48
Figura 23: Algoritmo de testes laboratoriais para ser validado pelo IAL na investigação de infecção por HTLV-1/2 em população de risco (Algoritmo IAL 2010)	52

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	1
1.2. Taxonomia	2
1.3. Características biológicas do HTLV-1/2	2
1.4. Resposta imunológica e patogênese	5
1.5. Epidemiologia	6
1.5.1. HTLV no mundo	6
1.5.2. HTLV no Brasil	8
1.6. Vias de transmissão	11
1.7. Diagnóstico	11
1.7.1. Testes de triagem sorológica	12
1.7.2. Testes confirmatórios	13
1.8. Diagnóstico de HTLV-1/2 no Instituto Adolfo Lutz	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	19
3.1. Casuística	19
3.2. Métodos	19
3.2.1. Desempenho dos EIAs e análise ROC	19

3.2.2. Avaliação do Algoritmo IAL 2007	20
3.2.3. Avaliação de ensaios sorológicos e moleculares ..	22
3.2.3.1. Testes sorológicos	23
3.2.3.2. Ensaios moleculares	23
3.3. Análise custo-benefício	27
3.4. Aspectos éticos	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Em 1980, foi isolado do sangue periférico de um paciente com linfoma de células T com manifestações cutâneas, o primeiro oncoretrovírus humano denominado vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) (Poiesz et al., 1980). Dois anos depois, outro retrovírus humano denominado HTLV-2 foi isolado de linfócitos de baço de um paciente com tricoleucemia de células T (Kalyanaraman et al., 1982); entretanto, seu papel como agente oncogênico não foi confirmado. Ambos os vírus apresentam aproximadamente 60% de similaridade genética (Seiki et al., 1983; Shimotohno et al., 1985).

Alguns estudos sugerem que as infecções por HTLV-1/2 tiveram início acerca de 10.000 - 20.000 anos e que os vírus oriundos da África e Ásia foram introduzidos nas Américas após sucessivas migrações humanas (Slattery et al., 1999; Gotuzzo et al., 2000).

O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e da doença neurológica degenerativa denominada paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) (Yoshida et al., 1982; Osame et al., 1987). No Brasil e no mundo, vários estudos associam o HTLV-1 a ATL e TSP/HAM e a outras síndromes neurológicas, artrites (Kitajima et al., 1991), uveítes (Mochizuki et al., 1992), doenças dermatológicas e urinárias (De Oliveira et al., 2005), manifestações oculares (Soares e Moraes Junior, 2000), pneumonias e a outras desordens pulmonares (Bittencourt et al., 2006; Carvalho et al., 2006).

Ao contrário do HTLV-1, o HTLV-2 não está associado a um tipo particular de doença, embora existam relatos de manifestações neurológicas semelhantes à TSP/HAM (Hall et al., 1994; Orland et al., 2003; Posada-Vergara et al., 2006), de predisposição a infecções bacterianas e manifestações dermatológicas em portadores assintomáticos usuários de

drogas injetáveis (UDI) (Murphy, 1996) e de associação com o aumento de mortalidade por câncer (Biswas et al., 2010).

Recentemente, dois novos tipos de HTLV, denominados HTLV-3 e HTLV-4 foram identificados em populações do sul de Camarões, na África Central, mas sem associação com doenças em humanos (Calattini et al., 2005; Mahieux e Gessain, 2009).

1.2. Taxonomia

Os vírus HTLV-1 e HTLV-2 integram a família *Retroviridae*. Estes retrovírus humanos estão geneticamente relacionados à subfamília *Oncovirinae*. Anteriormente, eram classificados como pertencentes ao gênero *Oncovírus* (nomenclatura contestada pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral), sendo atualmente integrantes do gênero *Deltaretrovírus* (Proietti, 2006).

1.3. Características biológicas do HTLV-1/2

Os HTLVs são vírus de forma esférica a pleomórfica (vírions) com 80-100 nanômetros de diâmetro, constituídos por um envelope glicoprotéico, um nucleocapsídeo e um nucleóide, morfológicamente semelhantes aos demais retrovírus. O envelope é formado por uma glicoproteína de superfície extracelular (gp46) e uma glicoproteína transmembrânica (gp21). Junto à membrana do envelope está a matriz composta pela proteína Gag (p19). O capsídeo possui simetria icosaédrica e contém proteínas codificadas pelo gene *gag* (p24) constituindo o cerne viral. O nucleóide é composto por duas cópias de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e pela enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do genoma viral de RNA para cDNA (provírus) (Franchini, 1995) (**Figura 1**).

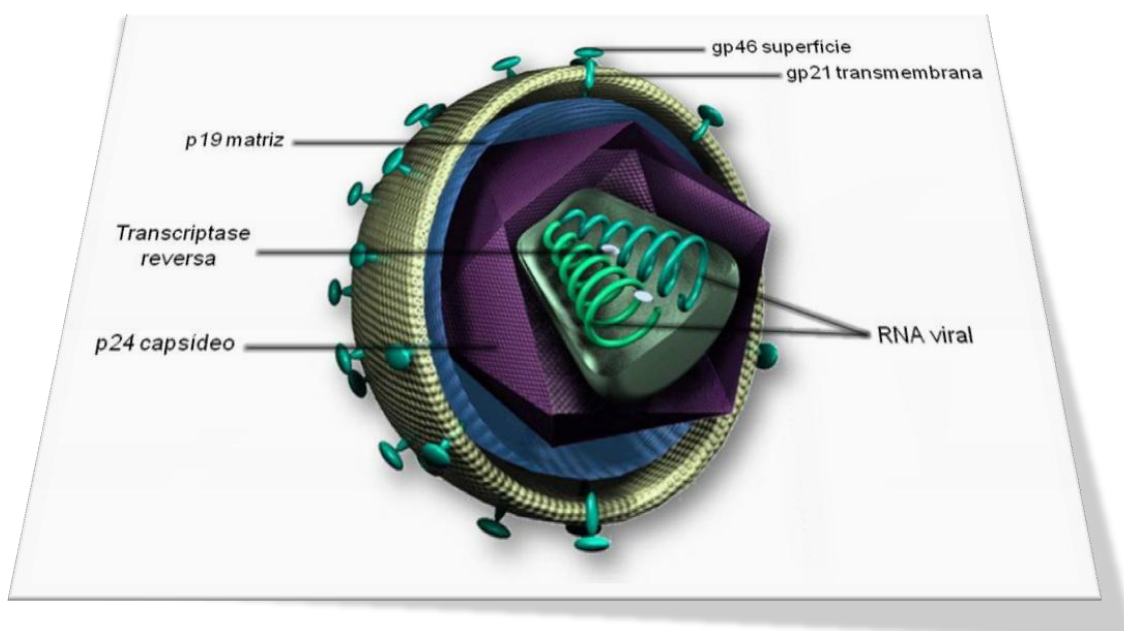


Figura 1: Estrutura da partícula viral do HTLV-1/2.

Legenda: gp46: glicoproteína de 46 KDa; gp21: glicoproteína de 21 KDa; p19: proteína de 19 KDa; p24: proteína de 24 KDa.

Fonte: Adaptado de Bio-mirror Web site. Disponível em: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/final2.jpg>

Além dos genes estruturais comuns aos retrovírus (*gag*, *env* e *pol*), o genoma do HTLV-1/2 ainda apresenta uma região próxima à extremidade 3' denominada *pX*, que exibe quatro regiões abertas para leitura (*ORF*) codificadoras de seis proteínas, entre elas as proteínas reguladoras Tax e Rex, tendo ainda, nas extremidades 5' e 3', uma região chamada de longa repetição (*LTR*) cujas seqüências são essenciais na regulação transcricional do genoma dos vírus HTLVs (apud Proietti, 2006) (**Figura 2**).

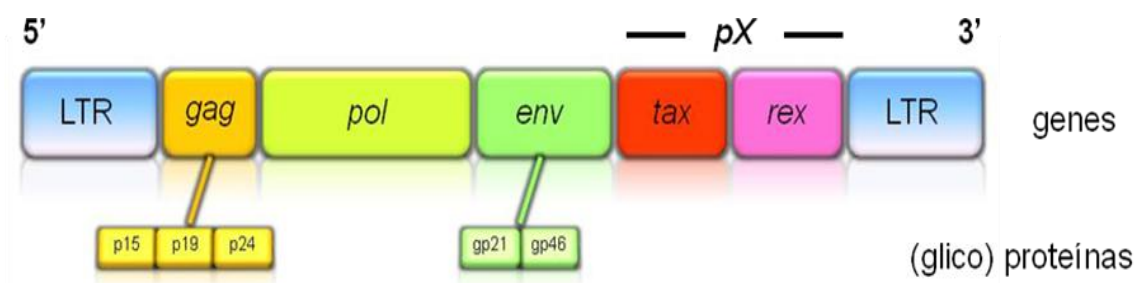


Figura 2: Representação esquemática do genoma do HTLV.

O HTLV-1 e o HTLV-2 diferenciam-se principalmente no gene *pX*, sendo, no entanto, semelhantes em cerca de 60% do genoma. Com propriedades biológicas semelhantes, agem infectando os linfócitos dos humanos, sendo que o tipo 1 tem tropismo preferencial por linfócitos T CD4+, enquanto o tipo 2 por linfócitos T CD8+. Ambos têm a capacidade de se integrar ao genoma da célula hospedeira e nesta forma recebem a denominação de provírus (Hall et al., 1994; Franchini, 1995).

Apesar de possuírem uma estrutura genômica comum, os HTLV-1 e HTLV-2 diferem em suas propriedades patogênicas que são geralmente atribuídas às proteínas transativadoras Tax, denominadas Tax 1 e Tax 2, respectivamente (Lewis et al., 2002; Grassmann et al., 2005), ambas responsáveis pela indução e expressão de genes celulares e pela promoção indireta da transcrição do genoma proviral (Franchini, 1995). Esses efeitos da Tax podem interferir nas funções da célula hospedeira em diferentes níveis, afetando a transcrição e a tradução de vários genes celulares, tais como genes de citocinas e protooncogenes, que podem influenciar no desenvolvimento da infecção e na patogênese das doenças associadas ao HTLV-1 (Franchini, 1995; Grassmann et al., 2005).

A variabilidade genética entre as cepas de HTLV-1 é relativamente pequena (4%) em comparação a sequência *env* do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (30%) (Ratner et al., 1991; Segurado et al., 2002). Estudos demonstram que as regiões *LTR* e *env* do HTLV-1 apresentam variabilidade entre diferentes isolados provirais, enquanto as regiões *gag* e *pol* apresentam uma alta similaridade. As mesmas variabilidades são observadas para o HTLV-2 (Switzer et al., 1995; Lewis et al., 2000; Covas e Kashima, 2003; Ishak et al., 2003). Por essa razão, as seqüências *LTR* são particularmente selecionadas para a caracterização genotípica dos subtipos virais dos HTLVs (Komurian-Pradel et al., 1992; Eiraku et al., 1995; Switzer et al., 1995; Salemi et al., 1998; Magri et al., 2010).

1.4. Resposta imunológica e patogênese

O HTLV-1 ao infectar células T CD4+ induz resposta de anticorpos pelos linfócitos B, dirigida primeiramente a antígenos de superfície viral (gp46, gp21) e posteriormente, de core (p15, p19, p24). Há indução de resposta do tipo celular (células T citotóxicas) que é direcionada principalmente à proteína Tax. Em indivíduos imunocompetentes, ocorre destruição das células infectadas e dependendo da intensidade da resposta imune e da carga viral de HTLV-1 com a qual o indivíduo foi infectado, haverá evolução para o estado de portador assintomático, ATL ou TSP/HAM. Os mecanismos de patogênese do HTLV-1 ainda não estão totalmente definidos, porém vários estudos apontam para maior influência de fatores genéticos do hospedeiro na evolução da infecção do que para fatores virais, uma vez que a variabilidade genética dos HTLV-1 é baixa (Satou e Matsuoka, 2010).

A proteína Tax do HTLV-1 desempenha importante papel nos processos de immortalização celular, oncogênese e inflamação. Ela transativa outros genes responsáveis pela produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases, tais como, o fator de necrose tumoral α , proteína quimiotática de monócitos e metaloproteinase de matrix. A proteína Tax tem importante papel no desenvolvimento da TSP/HAM por provocar intensa reação inflamatória. Já na ATL, cerca de 60% dos pacientes não expressam proteína Tax e neles, uma nova proteína denominada *HTLV-1 basic leucine zipper factor* (HBZ) foi recentemente implicada na proliferação de linfócitos T e na indução de ATL (Matsuoka e Green, 2009; Saito et al., 2009; Satou e Matsuoka, 2010).

O número aumentado de células CD4+ na infecção por HTLV-1, pode erroneamente dar a impressão de melhora clínica em pacientes co-infectados pelo HIV-1, e pode interferir também no início do tratamento antiretroviral (Schechter et al., 1994; Brites et al., 2001; 2009). Portanto, em pacientes co-infectados por HIV/HTLV-1 este parâmetro laboratorial deve ser cuidadosamente analisado.

Quanto à infecção por HTLV-2, poucos estudos apontam para potencial patogênico deste vírus, no entanto, alguns relatos de manifestações neurológicas foram atribuídos à infecção por HTLV-2 (Orland et al., 2003; Posada-Vergara et al., 2006; Novoa et al., 2007). Ainda, vários casos de doenças linfoproliferativas e desordens neurológicas em co-infectados por HIV/HTLV-2 foram relatados, principalmente em UDI (Zehender et al., 1995; Dooneief et al., 1996; Posada-Vergara et al., 2006).

Alguns estudos mostram que indivíduos co-infectados por HIV/HTLV-2 parecem “protegidos” ou se tornam progressores lentos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), talvez pela produção de quimiocinas que se ligam aos co-receptores do HIV, impedindo sua penetração na célula hospedeira (Beilke et al., 2004; Roucoux e Murphy, 2004; Turci et al., 2006; Bagheri et al., 2008). Diferentemente do que ocorre na co-infecção HIV/HTLV-2, o HTLV-1 promove aumento no número de células CD4⁺ e na replicação do HIV, com progressão mais rápida para AIDS (Schechter et al., 1994; Brites et al., 2001; Casoli et al., 2007; Brites et al., 2009).

1.5. Epidemiologia

1.5.1. HTLV no mundo

As infecções pelos vírus HTLV-1 e HTLV-2 têm sido descritas em diversas regiões do mundo, com variações significativas de soroprevalência de acordo com a área geográfica, o grupo étnico e/ou racial e o comportamento de risco da população. Estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo, sendo que 2 a 3% delas desenvolvem ATL e entre 1% e 2% a TSP/HAM (Edlich et al., 2000).

Em geral, dados de prevalência de infecção por HTLV-1/2 no mundo são obtidos em inquéritos epidemiológicos com população de bancos de sangue ou grupos de gestantes, pessoas com sintomas relacionados à

infecção viral e seus parentes, populações nativas e UDIs. Estudos que reportam taxas de prevalência na população geral são raros (Proietti, 2006).

A **Figura 3** apresenta a distribuição da prevalência para a infecção por HTLV-1 no mundo. Países onde algumas populações são endêmicas para HTLV-1 (taxas de prevalências entre 1% e 5%) são mostrados na cor marrom. Já os países onde algumas populações apresentam prevalência menor do que 1% são mostrados na cor mostarda (Proietti et al., 2005).

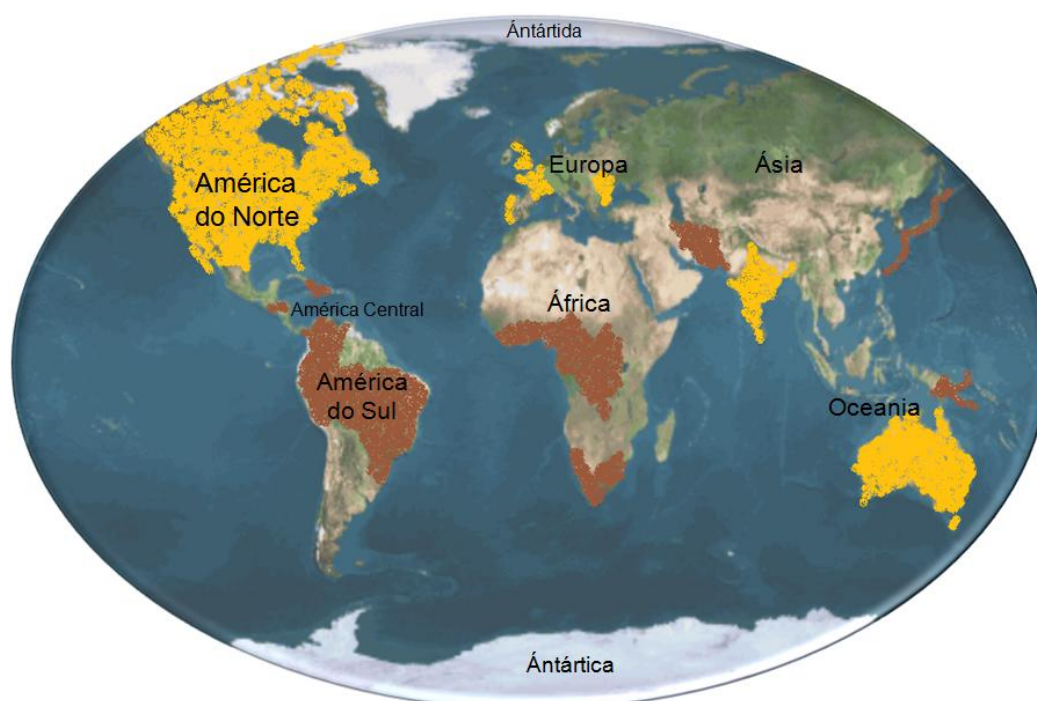


Figura 3: Epidemiologia global do HTLV-1.

Legenda: ■ Países com altas taxas de prevalência de HTLV-1.

■ Países com taxas de prevalência intermediária de HTLV-1.

Fonte: Adaptado de Proietti et al. (2005).

O **Quadro 1** apresenta as taxas de prevalência para a infecção por HTLV-1 em algumas populações de diferentes regiões geográficas.

Quadro 1: Prevalência de infecção por HTLV-1 reportadas em várias populações e em diversas regiões do mundo.

Regiões	País	Prevalência
América do Norte	Canadá e Estados Unidos	< 0,1%
Europa	Espanha, França, Itália e Reino Unido	< 0,1%
Caribe	Barbados, Guadalupe, Haiti, Jamaica, Martinica e Tobago	1 - 7%
América do Sul e Central	Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, Honduras, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela	0,3 - 10%
África	Camarões, Costa do Marfim, Gabão, Moçambique, Quênia, Tanzânia e Zaire	1 - 10%
Ilhas do Pacífico	Austrália, Malásia, Taiwan e Vietnã	1,7 - 14%
Japão	Kyushu e Okinawa	1 - 30%

Fonte: Adaptado de Lopes e Carneiro-Proietti (2008).

Já a infecção pelo HTLV-2 é freqüente em aborígenes das Américas do Norte e Sul (Ishak et al., 1995; Black et al., 1996; Gotuzzo et al., 2000; Menna-Barreto et al., 2005) e em nativos da África (Gessain e de Thé, 1996), com taxas de prevalência que variam de 1% a 58%, sendo também prevalente (1% a 50%) em UDIs de regiões urbanas dos Estados Unidos (Hall et al., 1996), América do Sul (Berini et al., 2007a; Morimoto et al., 2007) e Europa (Zella et al., 1990; Krook e Blomberg, 1994).

1.5.2. HTLV no Brasil

Estimativas com base em estudos de soroprevalência em doadores de sangue e em população geral apontam o Brasil como o país com o maior número absoluto de indivíduos soropositivos para HTLV-1/2 no mundo, com cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas (Proietti, 2006).

O HTLV-1 foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1986, em imigrantes japoneses provenientes de Okinawa, que residiam na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Kitagawa et al., 1986). Desde então, diversos inquéritos epidemiológicos apontam as regiões Norte e Nordeste como as com maior número de infecção por HTLV-1/2 no país (Galvão-Castro et al., 1997; Carneiro-Proietti et al., 2002).

Estudo com doadores de sangue de várias cidades do Brasil mostrou que a maior taxa de prevalência à infecção por HTLV-1/2 foi encontrada no Maranhão (10/1000) e a menor, em Santa Catarina (0,4/1000) (Catalan-Soares et al., 2005).

A cidade de Salvador, na Bahia, apresenta a maior prevalência de infecção por HTLV-1 na população geral, onde historicamente, se coestabeleceu a concentração de população negra, descendente de escravos africanos traficados para o Brasil durante os séculos XVII e XVIII. Já o HTLV-2, apresenta alta prevalência na Amazônia brasileira, principalmente em população indígena, e em UDI de áreas urbanas de todo o país, principalmente os infectados pelo HIV-1 (**Figura 4 e Quadro 5**).

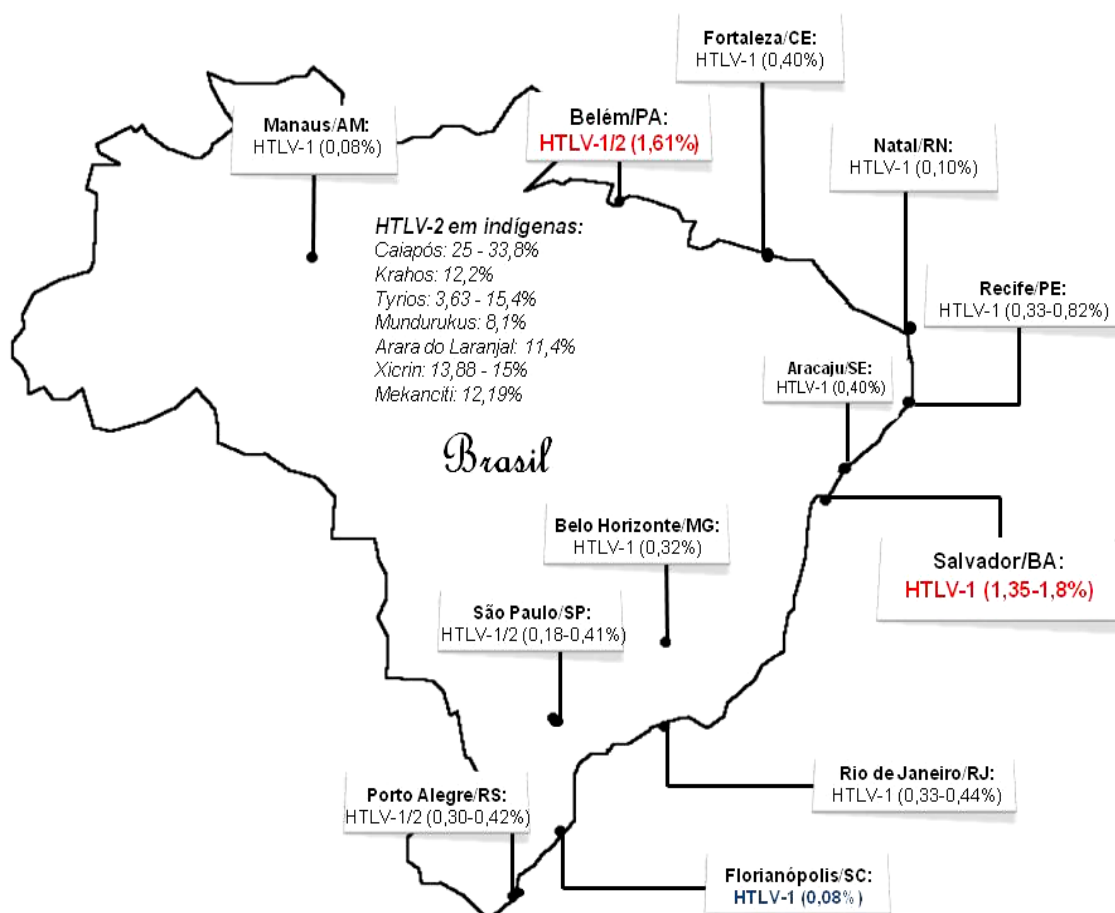


Figura 4: Prevalências de infecção por HTLV-1/2 reportadas no Brasil.

Fonte: Carneiro-Proietti et al. (2002).

Quadro 2: Prevalência de infecção por HTLV-1/2 reportadas em alguns estudos conduzidos com diferentes populações das várias regiões do Brasil.

Região	Cidade (UF)	População	N	Prevalência	Diagnóstico	Fonte
Sul	Florianópolis (SC)	Doadores de sangue	1.200	0,08% (HTLV-1)	WB	Galvão-Castro et al. (1997)
	Londrina (PR)	HIV + / HIV+UDI	758 / 57	0,8% / 7% (HTLV-1)	WB	Morimoto et al. (2005)
				4,9% / 43,8% (HTLV-2)		
Centro-Oeste	Campo Grande (MS)	Imigrantes japoneses	147	6,8% (HTLV-1)	-	Kitagawa et al. (1986)
	Estado do MS	Gestantes	32.512	0,1% (HTLV-1/2)	WB/PCR	Figueiró-Filho et al. (2005)
	Campo Grande (MS)	Gestantes	116.689	0,13% (HTLV-1/2)	WB/PCR	Dal Frabbo et al. (2008)
Sudeste	São Paulo (SP)	Doadores de sangue	17.063	0,18% (HTLV-1/2)	WB/PCR	Ferreira et al. (1995)
	Rio de Janeiro (RJ)	Doadores de sangue	1.200	0,33% (HTLV-1)	WB	Galvão-Castro et al. (1997)
	São Paulo (SP)	Doadores de sangue	18.169	0,1% (HTLV-1)	WB	Sabino et al. (1999)
				0,07% (HTLV-2)		
	São Paulo (SP)	HIV + / HIV+UDI	533 / 89	4% / 11,2% (HTLV-1)	WB	Caterino-de-Araujo et al. (1998)
				6,1% / 16,8% (HTLV-2)		
	Botucatu (SP)	Gestantes	913	0,1% (HTLV-1)	WB	Olbrich Neto e Meira (2004)
Nordeste	Recife (PE)	Doadores de sangue	1.200	0,33% (HTLV-1)	WB	Galvão-Castro et al. (1997)
				11,11% (HTLV-2)		
	Salvador (BA)	UDI	216	0,84% (HTLV-1)	WB	Dourado et al. (1999)
	Salvador (BA)	Gestantes	6.754	1,76% (HTLV-1)	WB/PCR	Bittencourt et al. (2001)
	Salvador (BA)	População geral	1.385	0,68% (HTLV-1)	WB	Dourado et al. (2003)
Norte	João Pessoa (PB)	Lactantes	1.033	37,4% (HTLV-2)	PCR	Pimenta et al. (2008)
	Kubenkokre (AM/PA)	Tribo indígena	107	1,71% (HTLV-1/2)	WB/PCR	Ishak et al. (2003)
	Belém (PA)	HIV +	117	3,42% (HTLV-1/2)	PCR	Laurentino et al. (2005)

Legenda: UF: Unidade Federativa do Brasil; N: número de amostras analisadas.

1.6. Vias de transmissão

Os HTLVs são transmitidos por relação sexual, contato com sangue contaminado e principalmente, pelo aleitamento materno prolongado, com transmissão vertical (de mãe para filho) ou transmissão horizontal (mães-de-leite) (Mueller, 1991; Bittencourt, 1998).

Em populações endêmicas as formas de transmissão vertical e sexual são as mais freqüentes vias de aquisição desses vírus, e em UDIs, principalmente infectados pelo HIV, pelo uso compartilhado de agulhas e seringas contaminadas (Casseb et al., 1997a; Morimoto et al., 2005).

Atento à forma parenteral de transmissão viral, o Ministério da Saúde (MS), em sua portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993, tornou obrigatória a realização da pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 em bancos de sangue do Brasil (Brasil, 1993). A janela imunológica do HTLV-1 adquirido por via transfusional é de 51 dias (36 a 72 dias; intervalo de confiança de 95%), porém a do HTLV-2 é desconhecida (Proietti, 2006).

No Estado do Mato Grosso do Sul, desde 2002, foi instituído Programa de Proteção à Gestante que inclui a sorologia para HTLV-1/2 no pré-natal como estratégia para controle de transmissão dessa infecção viral (Figueiró-Filho et al., 2005; Dal Fabbro et al., 2008). Em Minas Gerais, a Lei nº 17.344 dispõe que os serviços de saúde pública devem realizar testes sorológicos para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em casos com sintomatologia clínica sugestiva e em todas as gestantes no pré-natal. Inclui ainda, o aconselhamento clínico e familiar e o tratamento do infectado (Governo do Estado de Minas Gerais, 2008).

1.7. Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial do HTLV-1/2 se baseia na pesquisa de anticorpos específicos no soro ou de segmentos de DNA proviral em células do sangue periférico. Em vista dos prognósticos muito diferentes associados às infecções por HTLV-1 e HTLV-2, é fundamental que os testes

diagnósticos sejam capazes de distinguir a infecção pelos dois vírus, no contexto de confirmação sorológica, de aconselhamento ao infectado e na prática da rotina clínica.

1.7.1. Testes de triagem sorológica

Os testes de aglutinação de partículas (PA) que pesquisam anticorpos presentes no soro de indivíduos infectados têm sido utilizados em inquéritos epidemiológicos e, em alguns países, como testes de triagem e confirmatório de forma eficiente. No Japão, onde o HTLV-1 é endêmico, a utilização da reação de PA se mostra suficiente, devido a sua alta sensibilidade, rapidez e facilidade de execução (Kobayashi et al., 1988; Fujiyama et al., 1995; Kim et al., 1999).

Os ensaios imunoenzimáticos (EIAs) também detectam anticorpos no soro produzidos em resposta a antígenos virais codificados por genes estruturais e reguladores dos HTLVs (Brasil, 2003).

Em 1988, o *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, licenciou o primeiro *kit* para a detecção de anticorpos dirigidos ao HTLV-1, usando a técnica EIA, e este ensaio foi recomendado para a triagem de doadores de sangue e para a avaliação de pacientes com diagnóstico clínico sugestivo de ATL e de TSP/HAM (CDC, 1988; CDC, 1990). Desde então, os EIAs passaram por várias modificações em sua composição antigênica e formato em virtude da baixa sensibilidade e especificidade para detectar infecção por HTLV-2 (Hartley et al., 1991; Soriano et al., 1995; Andersson et al., 1999; Caterino-de-Araujo, 2009a).

Os testes EIA iniciais continham lisado viral de HTLV-1 (1ª geração), e a semelhança entre os genomas do HTLV-1 e HTLV-2 permitiram sua utilização na triagem sorológica do HTLV-2 (Wiktor et al., 1991; Kline et al., 1994). No entanto, a sensibilidade não era boa, apesar das reações-cruzadas (Hayes et al., 1991; Olaleye et al., 1995). Assim, esses testes foram substituídos por ensaios que, além do lisado viral de HTLV-1, continham proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos de HTLV-1 e

HTLV-2 (2ª geração). Mais recentemente foram desenvolvidos testes no formato sanduíche que contêm apenas proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos de HTLV-1 e HTLV-2 (3ª geração). Mesmo assim, após estas modificações, vários estudos conduzidos na América do Sul apontaram deficiências dos EIAs disponíveis no comércio para a detecção principalmente de HTLV-2, na maioria, em pacientes com HIV/AIDS (Casseb et al., 1997b; Morimoto et al., 2007; Berini et al., 2008; Caterino-de-Araujo, 2009b; Verdonck et al., 2009).

1.7.2. Testes confirmatórios

Após a triagem sorológica, as amostras reagentes nos EIAs podem ser confirmadas por diversos ensaios sorológicos como o *Western blot* (WB), imunofluorescência indireta (IFI) (Gastaldello et al., 1999), radioimunoprecipitação (RIPA) (Defer et al., 1995) ou imunoensaio de linha (INNO-LIA) (Zrein et al., 1998). Como o diagnóstico discriminatório do HTLV-1 e HTLV-2 é de suma importância para o aconselhamento e para direcionar a conduta clínica e terapêutica do paciente, em países onde o HTLV-1 e o HTLV-2 são endêmicos e onde os isolados virais podem divergir dos isolados empregados na composição dos *kits* utilizados na detecção de anticorpos específicos (Mahieux et al., 2000), há necessidade de se verificar qual o melhor teste confirmatório para ser usado no diagnóstico, embora nenhum desses testes seja reconhecido pelo FDA.

Assim como os EIAs, os testes confirmatórios, em especial o WB, têm sido modificados com o passar dos anos. Ao WB foram incorporadas glicoproteínas recombinantes do envelope do HTLV-1 e HTLV-2 (MTA-1/rgp46-I e K-55/rgp46-II, respectivamente), bem como a proteína recombinante transmembrânica GD21 comum para HTLV-1/2, conferindo maior especificidade ao teste (Wiktor et al., 1990; Lipka et al., 1992; Varma et al., 1995; Poiesz et al., 2000). No entanto, diversos estudos têm mostrado que a última versão do WB (HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics, Singapore) apesar de ser o teste confirmatório mais utilizado na rotina

diagnóstica no mundo, um grande número de resultados soroindeterminados é encontrado, com prevalências variando de 0,5% em doadores de sangue a 7,05% em população de risco (Césaire et al., 1999; Jacob et al., 2007). Estes achados têm sido relatados em todo o mundo incluindo o Brasil e outros países da América do Sul (Santos et al., 2003; Mangano et al., 2004; Quispe et al., 2009) e especialmente em nativos de áreas tropicais da África (Gessain et al., 1995).

Como nova alternativa para o diagnóstico confirmatório e discriminatório das infecções pelos HTLV-1/2, ensaios moleculares de amplificação genômica como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real, têm sido usados para a obtenção de resultados conclusivos para o diagnóstico (Vrieling et al., 1997; Estes e Sevall, 2003; Tamegão-Lopes et al., 2006; Andrade et al., 2010), principalmente em casos com padrão indeterminado persistentes no WB (Vitone et al., 2006; Costa e Segurado, 2009).

As técnicas de biologia molecular pesquisam o DNA proviral nos leucócitos do sangue periférico (PBL), uma vez que os HTLVs não apresentam viremia plasmática significativa, sendo necessária a coleta de sangue em tubo contendo anticoagulante.

1.8. Diagnóstico de HTLV-1/2 no Instituto Adolfo Lutz

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo [órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (IAL/CCD/SES-SP) e Laboratório de Referência no diagnóstico de retrovírus humanos] vem realizando a sorologia para HTLV-1/2 desde novembro de 1998. As amostras de sangue encaminhadas à Instituição provêm de pacientes atendidos em Ambulatórios de Especialidades do Sistema Único de Saúde (AE-SUS), Centros de Referência e Treinamento em AIDS (CRTA) e Unidades Hemoterápicas do Estado, e dificuldades no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2, têm sido descritas

(Caterino-de-Araujo et al., 1998; Jacob et al., 2007; 2008a; 2008b; 2009; Caterino-de-Araujo, 2009a; 2009b; Costa et al., 2009).

O algoritmo adotado pelo IAL difere do recomendado pelo MS (Brasil, 1998), pois usa dois testes EIA de composição antigênica e formatos diferentes na triagem sorológica, ao invés de um único EIA. Isto porque nenhum EIA disponível no comércio (1ª, 2ª ou 3ª geração) foi capaz de detectar todos os casos verdadeiramente soropositivos (WB) para a infecção por HTLVs, em casuística encaminhada a esta Instituição (Jacob, 2007). Ainda, o IAL emprega como teste confirmatório e discriminatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, o teste de WB, enquanto o MS recomenda a IFI seguida do WB.

Apesar da melhora na composição dos *kits* EIA que tem aumentado sua sensibilidade e especificidade, um grande número de soros com padrão indeterminado no teste confirmatório de WB continua sendo observado (Mahieux et al., 2000; Mangano et al., 2004; Berini et al., 2007b; Morimoto et al., 2007). No IAL, cerca de 35% dos soros de população de risco apresenta perfil indeterminado à análise pelo WB (Jacob et al., 2008a).

Além disto, uma avaliação mais detalhada dos resultados obtidos com os *kits* EIAs de 1ª, 2ª e 3ª gerações deve ser realizada, uma vez que ao contrário do que se esperava, com casuística de risco de São Paulo, os *kits* de 2ª geração se mostraram mais específicos e eficientes para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 do que os de 3ª geração, embora estes tenham se mostrado mais sensíveis (Jacob et al., 2007; Jacob et al., 2008a).

Levando em consideração esses resultados, foi proposto no ano de 2007 um novo algoritmo de testes laboratoriais a ser usado pelo IAL (Jacob, 2007) (**Figura 5**). Este algoritmo tomou como base o algoritmo recomendado pelo MS para o diagnóstico de infecção por HIV, onde são solicitadas duas amostras sequenciais de sangue quando a primeira resulta reagente (Brasil, 2005). Para o HTLV-1/2, a primeira amostra de sangue deve ser coletada em tubo seco para ser usada na triagem sorológica por dois EIAs. Em soros reagentes em pelo menos um EIA, uma segunda amostra de sangue é solicitada e o sangue coletado em tubo contendo anticoagulante. Nesta

amostra de sangue, o plasma é usado para repetir a triagem sorológica (dois EIAs) e para o teste confirmatório de WB. A fração de PBL é utilizada para a pesquisa de segmento de DNA de HTLV-1/2 (região *tax* do genoma proviral) pela PCR. Esta estratégia de coleta seqüencial de sangue evita resultados falsos (positivo e negativo) por falha humana de identificação e/ou manuseio das amostras de sangue, possibilita comparar o desempenho do WB em relação à PCR, e ainda auxilia em casos de soroconversão.

Portanto, o presente estudo visa encontrar a melhor estratégia para ser adotada no diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 no IAL, incluindo a avaliação de algoritmo, desempenho de *kits* de triagem sorológica e dos testes confirmatórios (sorológico e moleculares).

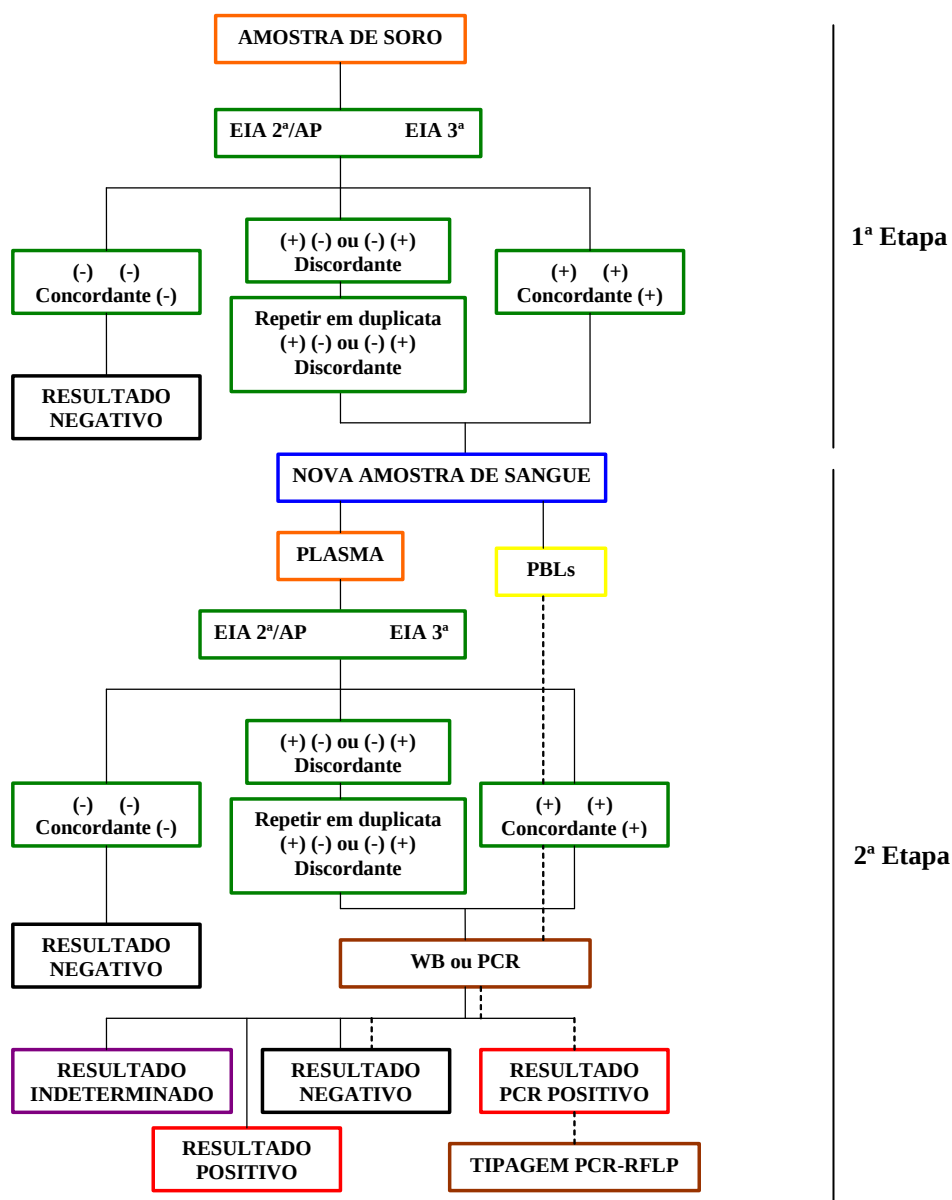


Figura 5: Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2007.

Legenda: (+): soro reagente; (-): soro não reagente; EIA: ensaio imunoenzimático; EIA 2ª: EIA de segunda geração; EIA 3ª: EIA de terceira geração; PBL: leucócitos do sangue periférico; WB: *Western blot*; PCR: reação em cadeia da polimerase; PCR-RFLP: análise de produto de PCR por polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática.

Fonte: Jacob (2007).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar algoritmos de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 com ênfase ao emprego da PCR convencional ou da PCR em tempo real como teste confirmatório, em casuística encaminhada ao IAL para análise.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o desempenho dos EIAs de 1ª, 2ª e 3ª gerações em relação ao WB;
- Verificar a eficácia do algoritmo de testes laboratoriais proposto no ano de 2007 pelo IAL;
- Avaliar os métodos moleculares de PCR convencional (*tax* e *pol*) e em tempo real (*pol*) como testes confirmatórios e discriminatórios de infecção por HTLV-1 e HTLV-2;
- Analisar criticamente os resultados obtidos com os testes confirmatórios (sorológico e moleculares) e sugerir um algoritmo de testes para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Compôs a casuística do presente estudo, 3.271 amostras de sangue provenientes da rotina diagnóstica do IAL dos anos de 1998 a 2010:

- Desempenho dos EIAs e análise ROC: 2.312 amostras de soros (1998-2006) provenientes de CRTA (60,25%) e AE-SUS (39,75%);
- Avaliação do algoritmo de testes laboratoriais proposto pelo IAL em 2007: 313 amostras de sangue (2009), sendo 85,60% de AE-SUS e 14,40% de CRTA;
- Ensaios confirmatórios (sorológico e moleculares): 73/959 amostras de sangue reagentes na triagem sorológica (2007-2010), sendo 90,41% de AE-SUS e 9,59% de CRTA.

3.2. Métodos

3.2.1. Desempenho dos EIAs e análise ROC

Primeiramente, os resultados dos EIAs de 1^a, 2^a e 3^a gerações expressos em valores de DO/*cut-off* foram analisados usando os testes de Mann-Whitney (dois grupos) ou Kruskal-Wallis (múltiplos grupos), adotando-se um nível de significância $p \leq 0,05$. Em seguida, foram determinados os valores de sensibilidade e especificidade dos EIAs conforme mostra a **Figura 6 (a)**.

O Programa GraphPad Prism®, versão 5.0. (San Diego, CA) foi usado para a análise ROC que ajusta o valor do *cut-off* da reação para o ponto em que há maior sensibilidade e menor número de resultados falso negativos. A construção da curva ROC considera os valores de DO em relação à sensibilidade e especificidade **Figura 6 (b)**.

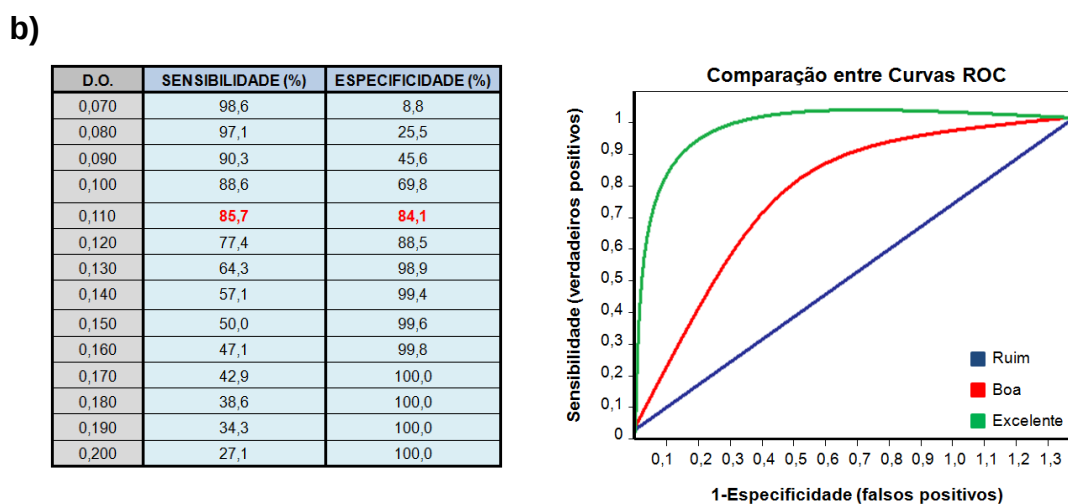
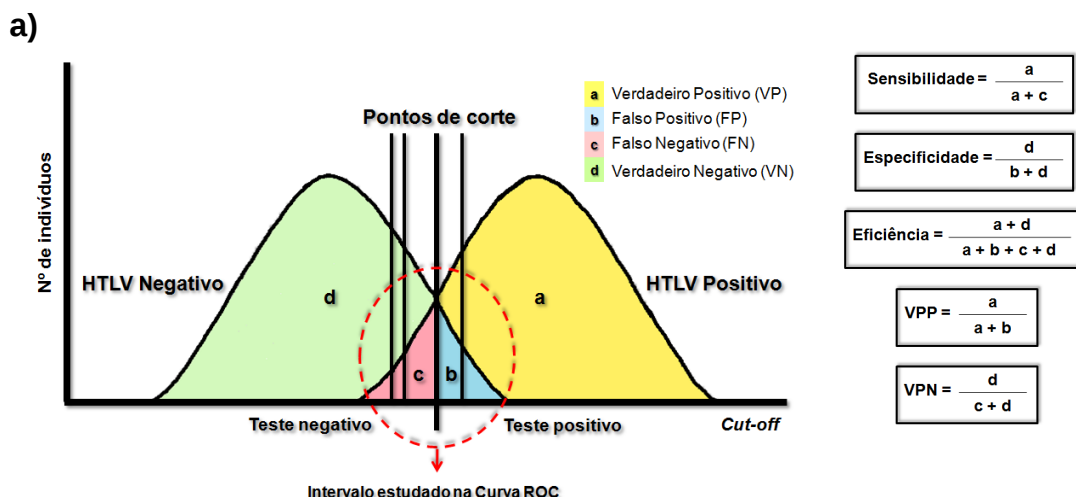


Figura 6: Representação esquemática do cálculo do valor de *cut-off* (ponto de corte) que discrimina casos HTLV-1/2 verdadeiramente positivos dos HTLV-1/2 negativos e análise ROC.

Fonte: Adaptado de Souza (2008).

3.2.2. Avaliação do Algoritmo IAL 2007

A tentativa de se adotar o algoritmo proposto em 2007 que utiliza duas amostras seqüências de sangue (**Figura 5**) foi feita com 313 casos encaminhados por CRTA (14,4%) e por AE-SUS (85,6%). A primeira amostra de sangue foi colhida em tubo seco, e o soro testado quanto à presença de anticorpos específicos por dois EIAs (BioELISA HTLV-I+II, Biokit de 2ª geração e Murex HTLV-I+II, Abbott de 3ª geração) seguindo as

instruções dos fabricantes. A composição e formato dos *kits* bem como as características dos ensaios sorológicos são mostrados no **Anexo 1**.

Em soros reagentes em pelo menos um EIA, uma segunda amostra de sangue foi solicitada, sendo coletada em tubo contendo anticoagulante. Nesta amostra de sangue, o plasma foi usado para repetir a triagem sorológica (dois EIAs) e nas amostras reagentes ou discordantes, os plasmas foram submetidos ao teste confirmatório de WB (HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics, Singapore) seguindo critérios do fabricante. Os padrões de reatividade mais freqüentemente encontrados no WB são descritos na **Figura 7**.

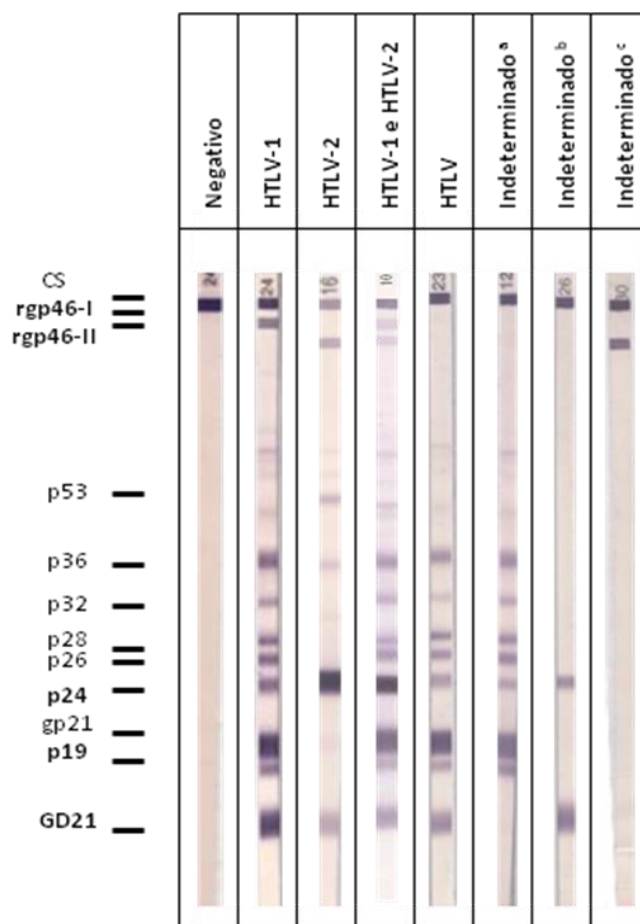


Figura 7: Padrão de reatividade do *Western blot* (HTLV Blot 2.4, Genelabs), segundo o fabricante Genelabs Diagnostics® (Singapore).

Legenda: Interpretação dos resultados. Negativo: nenhuma reatividade para as bandas específicas do HTLV-1/2; HTLV-1 soropositivo: reatividade para bandas dos genes *gag* (p19 com ou sem a p24) e *env* (GD21 e rgp46-I); HTLV-2 soropositivo: reatividade para bandas

dos genes *gag* (p24 com ou sem a p19) e *env* (GD21 e rgp46-II); HTLV-1 e HTLV-2 soropositivo: reatividade para bandas dos genes *gag* (p24 e p19) e *env* (GD21, rgp46-I e rgp46-II); HTLV positivo, mas não tipado: reatividade para bandas dos genes *gag* (p19 e p24) e *env* (GD21); indeterminado: reatividade para bandas específicas do HTLV, mas não preenchem os critérios de positividade para o HTLV-1, ou HTLV-2 ou HTLV. Amostras representativas de alguns padrões indeterminado: Indeterminado^a: todas as bandas, exceto rgp46-I, rgp46-II e GD21; Indeterminado^b: GD21, p24; Indeterminado^c: GD21 (TL) e rgp46-II; TL: traços leves; CS: controle da qualidade do soro.

A fração PBL foi utilizada para a extração de DNA com o *kit* PureLink™ Genomic DNA, Invitrogen™ e seguiu as instruções do fabricante. A pesquisa de segmento do genoma proviral de HTLV-1/2 pela PCR (região *tax*) foi otimizada e realizada segundo protocolos descritos por Heneine et al. (1992), Gallego et al. (2004), Costa (2004) e Gudo et al. (2009). Os produtos da PCR *tax* foram analisados quanto a fragmentos de restrição enzimática (PCR-RFLP) usando a enzima *Taq* I que apresenta sítio em fragmento *tax* de HTLV-2 e, portanto, discrimina HTLV-1 de HTLV-2 (Tuke et al., 1992). A relação de *primers* utilizados na PCR e *n*-PCR (*tax*) e o protocolo de reação encontram-se adiante.

3.2.3. Avaliação de ensaios confirmatórios (sorológico e moleculares)

De outubro de 2007 até agosto de 2010, 959 amostras de soro/sangue foram encaminhadas ao Centro de Imunologia do IAL para diagnóstico de infecção por HTLV-1/2. Destas, 486 pertenciam a homens e em ambos os gêneros a idade média foi de 33 anos. Noventa e duas amostras foram submetidas ao teste confirmatório de WB e 73 puderam ser avaliadas posteriormente pelos ensaios moleculares (**Tabela 1**).

Tabela 1: Número de amostras de soro/plasma encaminhadas ao IAL para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 com resultados reagentes e/ou discordantes nos EIAs e que foram submetidas à confirmação sorológica pela técnica de WB (2007 a 2010).

Resultados do WB	Espécime clínico encaminhado		Total (%)
	Soro n (%)	Sangue n (%)	
HTLV-1	5 (26,31)	24 (32,88)	29 (31,52)
HTLV-2	6 (31,59)	21 (28,78)	27 (29,35)
HTLV não tipado	1 (5,26)	3 (4,10)	4 (4,35)
Indeterminado	2 (10,53)	16 (21,92)	18 (19,56)
Negativo	5 (26,31)	9 (12,32)	14 (15,22)
Total (%)	19 (100)	73 (100)	92 (100)

Legenda: WB: HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics; n: número de amostras de soro e plasma/PBL.

3.2.3.1. Testes sorológicos

Os ensaios sorológicos de triagem foram realizados com *kits* de 2ª geração (BioELISA HTLV-I+II, Biokit, Barcelona, Spain) e 3ª geração (Murex HTLV-I+II, Abbott, Foster City, CA, EUA) e para a confirmação sorológica de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, foi utilizado o teste confirmatório de *Western blot* (HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics, Singapore). Todos os ensaios sorológicos foram realizados e interpretados de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.2.3.2. Ensaios moleculares

Para as análises moleculares foram pesquisados segmentos do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2 pelas técnicas de *n*-PCR e PCR em tempo real (regiões *tax* e *pol*).

Resumidamente, para amplificação de segmento da região *tax* dos HTLV-1/2 pela PCR convencional foi utilizado o conjunto de *primers* SK43/SK44 na PCR primária e, Tax1/Tax2 na *n*-PCR (Heneine et al., 1992), e para a discriminação de HTLV-1 de HTLV-2, foi pesquisado sítio de restrição enzimática *Taq I* (Tuke et al., 1992).

Ainda, para a pesquisa de segmento genérico da região *pol* de HTLV-1/2 na PCR convencional foi usado o conjunto de *primers* SK110/SK111 e, para a identificação de HTLV-1 na *n*-PCR, os *primers* POL 1.1/POL 3.1, enquanto para o HTLV-2 foram empregados os *primers* POL 1.2/POL 3.2 (Heneine et al., 1992). Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visibilizados sob luz ultravioleta.

Para a PCR em tempo real foi utilizado o sistema Taq Man® (Applied Biosystems, USA) de três seqüências alvo: o gene da albumina humana como controle endógeno e os genes *pol* de HTLV-1 e HTLV-2. Os *primers* e sondas, assim como o protocolo de reação foram adaptados à descrição de Tamegão-Lopes et al. (2006).

Todos os ensaios moleculares foram conduzidos em duplicata e em alguns casos em triplicata.

Os resultados dos WB em relação às PCRs foram analisados pelo teste de χ^2 (qui-quadrado) usando nível de significância $p \leq 0,05$.

Os **Quadros 3 e 4** mostram os *primers*, sondas e produtos esperados nos ensaios moleculares, bem como as condições de reação.

Quadro 3: *Primers* e sondas utilizadas nas reações de PCR convencional (*tax* e *pol*) e PCR em tempo real (*pol*) para a detecção de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 e da albumina humana em leucócitos de sangue periférico (PBL).

Técnica e genes pesquisados	Primers e sondas	Seqüência 5' – 3' e nº de nucleotídeos ()	Localização ^a
			Genoma (nt)
<u>PCR convencional</u>			
PCR-tax	SK 43	5' CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT 3' (20pb)	7359 - 7378
	SK 44	5' GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG 3' (21pb)	7517-7497
n-PCR tax	TAX 1	5' GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA 3' (20pb)	7375-7394
	TAX 2	5' CCA TCG ATG GGG TCC CA 3' (17pb)	7502-7486
PCR-pol	SK 110	5' CCH TAC AAY CCM ACC AGC TCA G 3' (22 pb)	4758-4779
	SK 111	5' GTG GTG RAC YTG CCA TCG GGT TTT 3' (24 pb)	4943-4920
n-PCR pol (HTLV-1)	POL 1.1	5' TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC 3' (24 pb)	4783-4806
	POL 3.1	5' TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG 3' (24 pb)	4918-4895
n-PCR pol (HTLV-2)	POL 1.2	5' CCT GGT CGA GAG AAC CAA TGG TG 3' (23 pb)	4758-4780
	POL 3.2	5' CCA CTG GGG TTC ATG ACA TTT AGC 3' (24 pb)	4895-4872
<u>PCR em tempo real</u>			
pol	HTLV-1 F	5' GAA CGC TCT AAT GGC ATT CTT AAA ACC 3' (27 pb)	4788-4814
	HTLV-1 R	5' GTG GTT GAT TGT CCA TAG GGC TAT 3' (24 pb)	4895-4872
	HTLV-2 F	5' CAA CCC CAC CAG CTC AGG 3' (18 pb)	4740-4757
	HTLV-2 R	5' GGG AAG GTT AGG ACA GTC TAG TAG ATA 3' (27 pb)	4830-4803
	Albumina F	5' GCT CAA CTC CCT ATT GCT ATC ACA 3' (24pb)	16222-16245
	Albumina R	5' GGG CAT GAC AGG TTT TGC AAT ATT A 3' (25pb)	16351-16327
	HTLV-1	5' FAM - ACA AAC CCG ACC TAC CC - NFQ 3' (17 pb)	4837-4852
	HTLV-2	5' FAM - TCG AGA GAA CCA ATG GTA TAA T - NFQ 3' (22pb)	4763-4784
	Albumina	5' FAM - TTG TGG GCT GTA ATC AT - NFQ 3' (17 pb)	16294-16310

Legenda: pb: pares de bases nitrogenadas; FAM: *fluorescent reporter dye*, 6-carboxy-fluorescein; NFQ: *non-fluorescent quencher*; n-PCR: *nested* PCR; ^a : posição dos nucleotídeos nos genomas do HTLV-1 (linhagem ATK, número de acesso em GenBank J02029), HTLV-2 (linhagem MoT, número de acesso em GenBank M10060) e soro albumina humana (número de acesso em GenBank M12523).

Quadro 4: Protocolos adotados nas reações de PCR convencional (*tax* e *pol*) e PCR em tempo real (*pol*) para a identificação dos segmentos genômicos de HTLV-1 e HTLV-2 em leucócitos do sangue periférico (PBL).

Condições de reação	PCR convencional			PCR em tempo real	
	tax		pol	pol	
	PCR / n-PCR	RFLP	PCR / n-PCR		
Reagentes					
Tampão Tris-EDTA 10X	5 µL	2 µL	5 µL	Master Mix	15 µL
MgCl ₂ 50 mM	2,5 µL	-	2,5 µL		
Solução de dNTPs (10 mM - cada)	2 µL	-	1 µL		
Primer sense (20 pmol/µL)	1 µL	-	1 µL	Primer sense (12,5 pmol/µL)	0,5 µL
Primer anti-sense (20 pmol/µL)	1 µL	-	1 µL	Primer anti-sense (12,5 pmol/µL)	0,5 µL
Taq 5 U/µL	0,5 µL	-	0,5 µL	Sonda FAM-NFQ	0,5 µL
H ₂ O q.s.p. 50 µL	33 µL	11 µL	34 µL	H ₂ O q.s.p. 30 µL	8,5 µL
Taq I 10 U/µL	-	2 µL	-		
Amostra de DNA	5 µL	5 µL	5 µL	Amostra de DNA	5 µL
Volume final	50 µL	20 µL	50 µL		30 µL
Termociclagem					
PTC-100™, MJ Research para PCR conencional	45 X	94°C - 1'	65°C - 5h	35 X	94°C - 4'
		94°C - 30"	85°C - 30'		94°C - 1'
		55°C - 30"	20°C - ∞		62°C - 1'
		72°C - 30"			72°C - 2'
		72°C - 7'			72°C - 7'
LC 480, Roche para PCR em tempo real		20°C - ∞			20°C - ∞
				50 X	50°C - 2'
					95°C - 10'
					90°C - 50"
					60°C - 1'
Tamanho dos amplificados					
HTLV-1	159pb	128pb	128pb	186pb	136pb
HTLV-2			69/53pb		138pb
Albumina	-	-	-	-	-
					108pb
					91pb
					130pb

Legenda: Master Mix (Taq Man® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA). q.s.p.: quantidade suficiente para; pb: pares de bases nitrogenadas; FAM: *fluorescent reporter dye*, 6-carboxy-*fluorescein*; NFQ: *non-fluorescent quencher*.

3.3. Análise custo-benefício

A análise do custo-benefício dos ensaios confirmatórios considerou o preço de *kits* (HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics e PureLink™ Genomic DNA, Invitrogen™) e de material de consumo (*primers*, sondas, enzimas, marcadores de peso molecular, tampões, descartáveis, EPIs), tempo gasto na sua execução, número de repetições, geração de produtos tóxicos e a infraestrutura necessária. Não foram computados os valores de equipamentos, pois estes já existiam no Laboratório.

3.4. Aspectos éticos

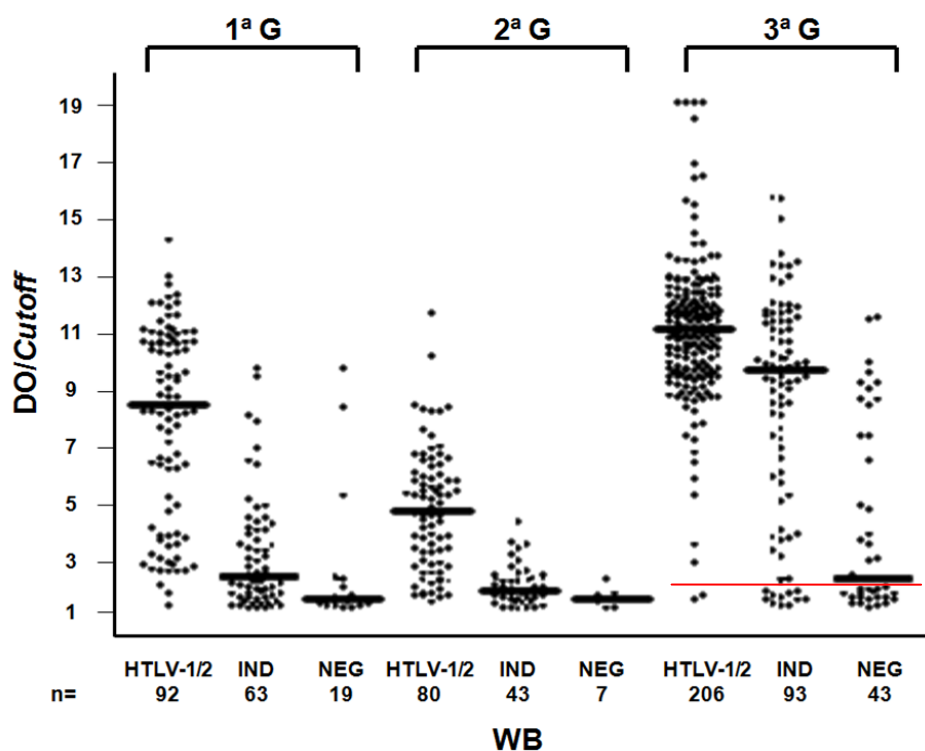
O projeto foi aprovado pelos Comitês Científico e de Ética em Pesquisa do IAL (CCD-BM # 33/07) (**Anexos 2 e 3**).

4. RESULTADOS

4.1. Curva ROC

Dos 2.312 soros avaliados quanto à presença de anticorpos anti-HTLV-1/2 pelos ensaios EIA de 1ª, 2ª e 3ª geração, 461 foram submetidos ao teste confirmatório de WB. Pelo WB, estes soros foram classificados como HTLV-1 (n=134), HTLV-2 (n=68), HTLV-1 e HTLV-2 (n=3) ou HTLV (n=14) positivos; indeterminados (n=163) e negativos (n=79). Os valores de DO/Cut-off destes soros em relação ao resultado de WB são apresentados na **Figura 8**. Valores mais altos de DO/Cut-off foram detectados com os kits de 3ª geração (**a**), independentemente de serem HTLV-1, HTLV-2 ou HTLV positivos (**b**). Usando a análise ROC nas amostras HTLV negativas e HTLV positivas, foi observado que um ajuste nos valores de DO/Cut-off (de 1,0 para 2,1) foi capaz de aumentar a especificidade dos kits EIA de 3ª geração em 7,8%, sem alterar significativamente sua sensibilidade [perda de apenas duas amostras reagentes em 206 amostras verdadeiramente positivas (**a**)]. Para os kits de 1ª e 2ª gerações não houve necessidade de ajuste da DO/Cut-off, pois o valor de cut-off sugerido pelo fabricante foi semelhante ao obtido pela curva ROC. A **Figura 8** mostra detalhes dos resultados dos EIAs, das diferenças estatisticamente significantes entre esses resultados e os do WB, e o resultado final da análise ROC. Estes resultados encontram-se publicados (Jacob et al., 2009, no **Anexo 4**).

a)



b)

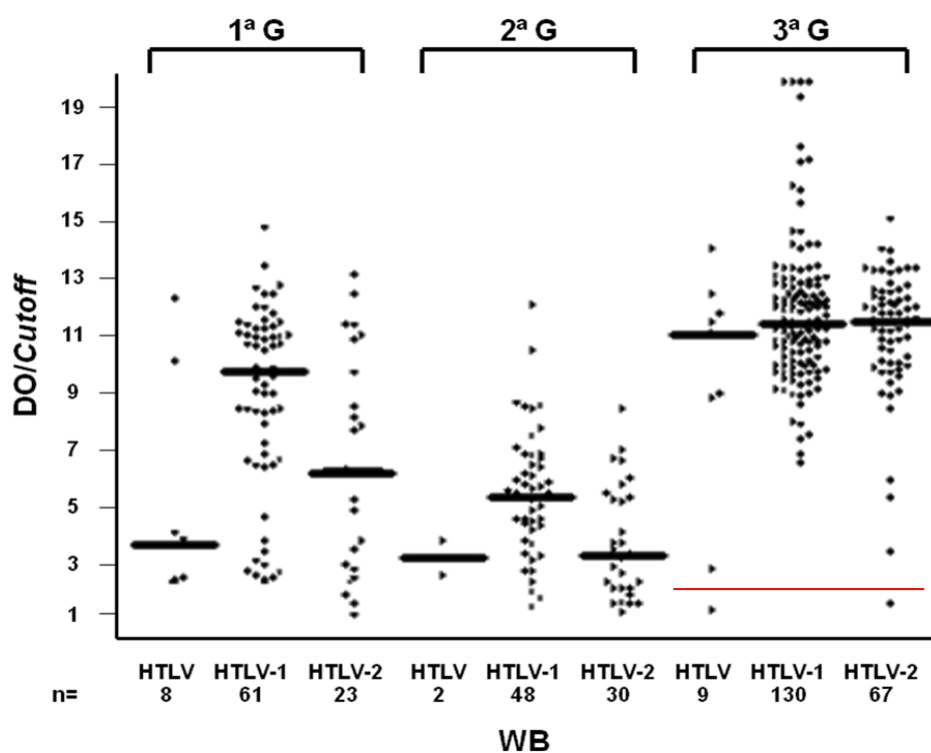


Figura 8: Valores de DO/Cut-off dos EIAs de 1ª, 2ª e 3ª gerações de acordo com os resultados do WB.

Legenda: a) Kruskal Wallis: HTLV-1/2 vs. HTLV-1/2: $p < 0,001$; IND vs. IND $p < 0,001$; NEG vs. NEG $p = 0,002$. **b)** Kruskal Wallis: HTLV vs. HTLV $p = 0,199$; HTLV-1 vs. HTLV-1 $p < 0,001$; HTLV-2 vs. HTLV-2 $p < 0,001$; HTLV vs. HTLV-1 vs. HTLV-2 $p = 0,011$ para 1ª geração; HTLV vs. HTLV-1 vs. HTLV-2 $p = 0,002$ para 2ª geração; HTLV vs. HTLV-1 vs. HTLV-2 $p = 0,302$ para 3ª geração. Mann-Whitney: HTLV-1 vs. HTLV $p = 0,025$ para 1ª geração; HTLV-1 vs. HTLV $p = 0,140$ para 3ª geração; HTLV-1 vs. HTLV-2 $p = 0,019$ para 1ª geração; HTLV-1 vs. HTLV-2 $p < 0,001$ para 2ª geração; HTLV-1 vs. HTLV-2 $p = 0,574$ para 3ª geração. As linhas espessas indicam os valores médios de DO/*Cutoff* e a linha em vermelho, o melhor valor de DO/*Cut-off* obtido pela curva ROC para os kits de 3ª geração.

4.2. Avaliação do Algoritmo IAL 2007

Das 313 amostras de soro analisadas, 36 resultaram pelo menos um EIA reagente (11,5%) (*cut-off* estabelecido pelo fabricante) sendo requisitada nova coleta de sangue à respectiva unidade de origem dos pacientes. Uma segunda amostra de sangue foi coletada somente de nove (25%) pacientes, sendo que em apenas três (33%) pacientes o sangue foi coletado corretamente.

Os nove soros reagentes na triagem sorológica foram submetidos ao teste confirmatório de WB. Destes, quatro resultaram HTLV-2 positivos, um HTLV não tipado, três indeterminados e um negativo. As três amostras de sangue coletadas em tubo contendo anticoagulante foram as que resultaram WB indeterminadas, e uma com perfil GD21, p24 confirmou infecção por HTLV-2 na PCR (*tax* e *pol*). Infelizmente, o pequeno número de amostras de PBL não permitiu comparar os resultados do WB com os da PCR (Costa et al., 2009, no **Anexo 5**).

O algoritmo foi abandonado por se mostrar inapropriado para a rotina diagnóstica do IAL. Um novo fluxograma de etapa única foi implantado, que usa sangue coletado em tubo contendo anticoagulante para avaliação sorológica e molecular simultaneamente (2ª etapa da **Figura 5**).

4.3. Ensaios confirmatórios (sorológico e moleculares)

4.3.1. Otimização da PCR convencional (*tax* e *pol*) e da PCR em tempo real (*pol*) na confirmação molecular da infecção por HTLV-1/2

Com a finalidade de otimizar e avaliar a sensibilidade das reações de *n*-PCR e PCR em tempo real para a amplificação das regiões *tax* e *pol* do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2 foram utilizados DNAs extraídos de duas linhagens celulares: C91/PL e BBF. A linhagem C91/PL infectada por HTLV-1 foi obtida em co-cultura de células de cordão umbilical de recém-nascidos e linfócitos do sangue periférico de paciente P.L. dos Estados Unidos, que apresentava linfoma de células T (Popovic et al., 1983). A linhagem BBF infectada por HTLV-2 foi obtida em co-cultura de células B (linhagem BJAB de linfoma de Burkitt, Epstein-Barr negativa) e do sangue periférico de paciente B.F., UDI HIV+ da Itália, infectada por HTLV-2b (Calabrò et al., 1993; Gasperini et al., 2005). Como controle endógeno de reação foi pesquisado segmento de DNA de albumina humana. Cada reação contou também com um DNA (controle negativo) proveniente de um caso que resultou HTLV-1/2 não reagente nos testes de triagem e negativo no teste confirmatório de WB. Foram feitas diluições seriadas de DNA partindo de uma concentração inicial de 200 ng/μL até a concentração final de 0,0002 ng/μL e utilizados 5 μL de DNA alvo em cada PCR (concentração final variando de 1000 ng a 1 pg). Foram empregadas três concentrações de *primers* e sondas (50, 25 e 12,5 pmol/μL, dados não mostrados) e selecionada a menor concentração que resultou em PCR em tempo real positiva (12,5 pmol/μL). Os protocolos de *n*-PCR (*tax* e *pol*) e de PCR em tempo real (*pol*) foram baseados nas publicações de Heneine et al. (1992), Tuke et al. (1992), Tamegão-Lopes et al. (2006) e Costa e Segurado (2009), com algumas adaptações para o laboratório e encontram-se descritos em Casuística e Métodos. A **Tabela 2** apresenta os resultados obtidos nos ensaios moleculares de acordo com a diluição das amostras de DNA.

Tabela 2: Sensibilidade das técnicas de *n*-PCR e PCR em tempo real na amplificação de segmentos do genoma proviral de HTLV-1/2 (regiões *tax* e *pol*) presentes em linhagens C91/PL (HTLV-1) e BBF (HTLV-2) e de segmento da albumina humana (controle endógeno).

Técnica e região genômica	Controles positivos e endógeno	Concentração de DNA								
		1000 (ng)	500 (ng)	250 (ng)	100 (ng)	10 (ng)	1000 (pg)	100 (pg)	10 (pg)	1 (pg)
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a
<i>n</i> -PCR (<i>tax</i>)	C91/PL	+	+	+	+	+f	-	-	-	-
	BBF	+	+	+	+	+f	-	-	-	-
<i>n</i> -PCR (<i>pol</i>)	C91/PL	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	BBF	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PCR em tempo real (<i>pol</i>)	C91/PL	+	+	+	+	+f	-	-	-	-
	BBF	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	Albumina	+	+	+	+	+	+	+	+f	-

Legenda: ng: nanograma; pg: picograma; PCR: reação em cadeia da polimerase; *n*-PCR: *nested* PCR; C91/PL: linhagem celular infectada por HTLV-1; BBF: linhagem celular infectada por HTLV-2; (-): PCR negativa; (+f): PCR positiva fraco; (+): PCR positiva.

A sensibilidade da *n*-PCR *tax* para HTLV-1 e HTLV-2 foi a mesma, ou seja, 10 ng de DNA alvo (5^a diluição do DNA). Para a região *pol*, a sensibilidade da *n*-PCR foi de 100 ng de DNA alvo para HTLV-1 (4^a diluição) e 1000 pg para HTLV-2 (6^a diluição, 100X maior). Já a PCR em tempo real foi 10X mais sensível que a *n*-PCR para HTLV-1 (5^a diluição) e mostrou mesma sensibilidade que a *n*-PCR para HTLV-2. A reação de PCR em tempo real para segmento de DNA da albumina humana foi capaz de detectar 10 pg de DNA alvo.

A **Figura 9 (a, b e c)** mostra os produtos da *n*-PCR *tax* e *pol*, e da PCR em tempo real (*pol*) dos DNAs amplificados da linhagem C91/PL infectada por HTLV-1.

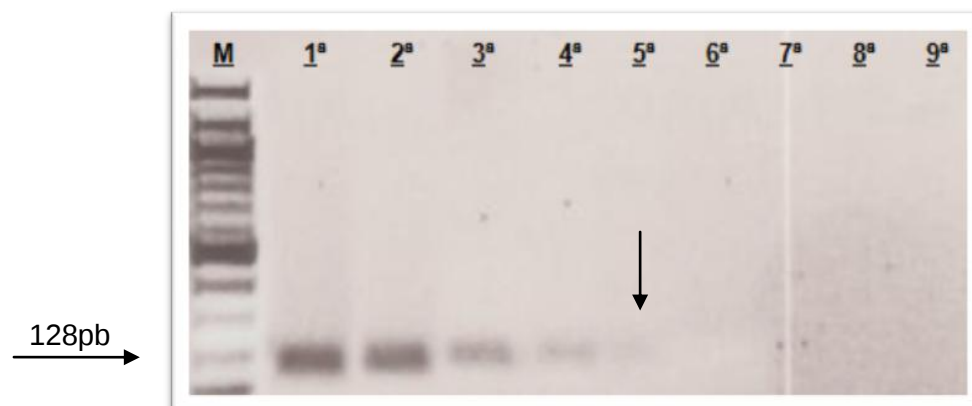
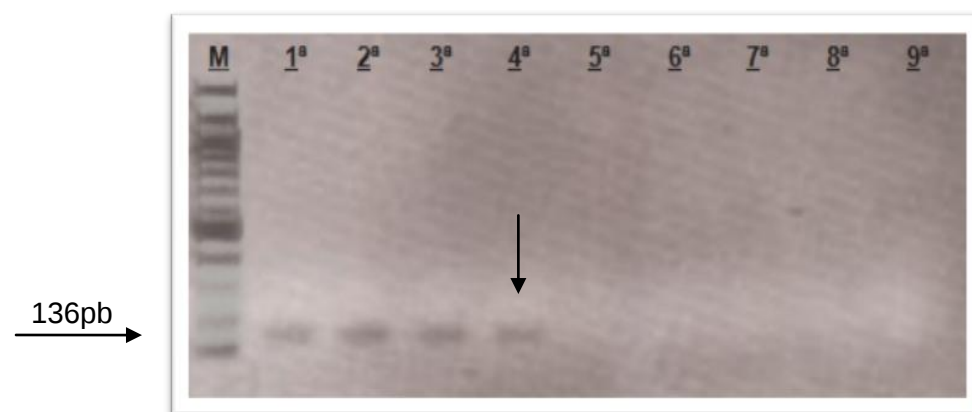
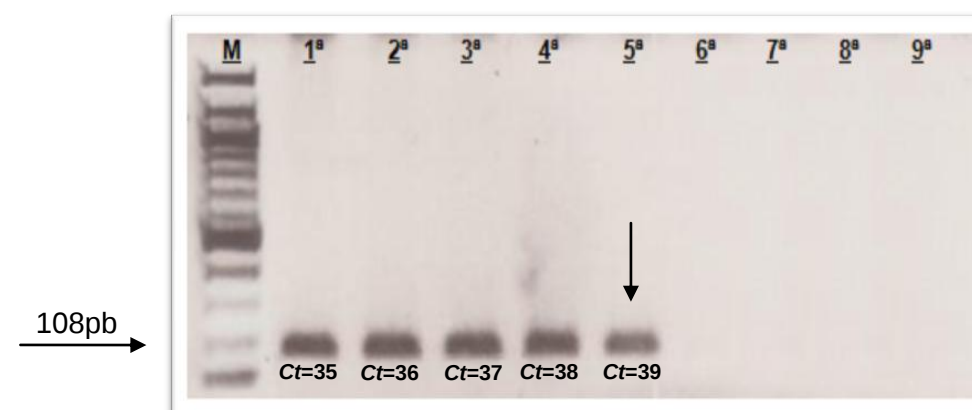
a) Linhagem C91/PL: *n*-PCR (*tax*)**b) Linhagem C91/PL: *n*-PCR (*pol*)****c) Linhagem C91/PL: PCR em tempo real (*pol*)**

Figura 9: Produtos de amplificação da *n*-PCR (*tax* e *pol*) e da PCR em tempo real (*pol*) obtidos a partir de diluições seriadas de DNA da linhagem celular infectada com HTLV-1 (C91/PL), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Legenda: M: DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen); 1ª a 9ª (concentrações de DNA 1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg). As setas à esquerda indicam o tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb) e as setas na posição vertical, o limite de detecção do produto amplificado nas PCRs.

As curvas de emissão de fluorescência dos produtos amplificados na PCR em tempo real (diluições seriadas de DNA) em relação ao número de ciclos da PCR são apresentadas na **Figura 10**. Os valores de *cycle threshold* (Ct) aparecem em evidência e mostram claramente o aumento no número de ciclos necessários para gerar uma PCR em tempo real positiva com o aumento da diluição de DNA (Ct de 35 a 39).

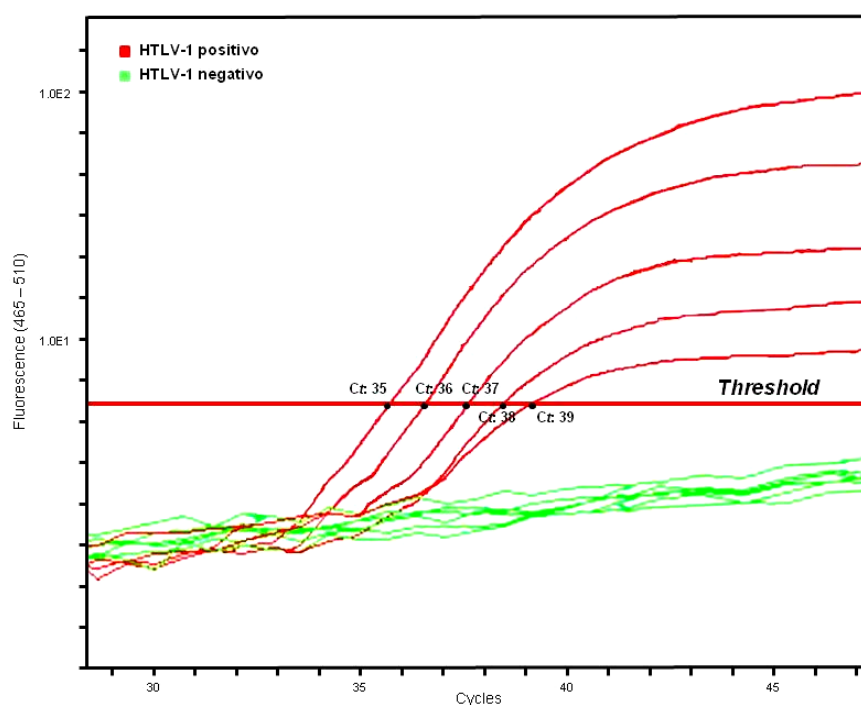


Figura 10: Número de ciclos (*cycle threshold*) necessários para resultar numa PCR em tempo real *pol* positiva em amostras de DNA obtidas de linhagem celular infectada por HTLV-1 (C91/PL), usando diluições seriadas de DNA (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg).

Legenda: *Threshold*: valor de fluorescência ideal para discriminar uma amostra positiva de uma negativa na PCR em tempo real; *Ct*: *cycle threshold*.

A **Figura 11** mostra os resultados obtidos nos ensaios moleculares para a linhagem BBF infectada por HTLV-2 apresentados na **Tabela 2**.

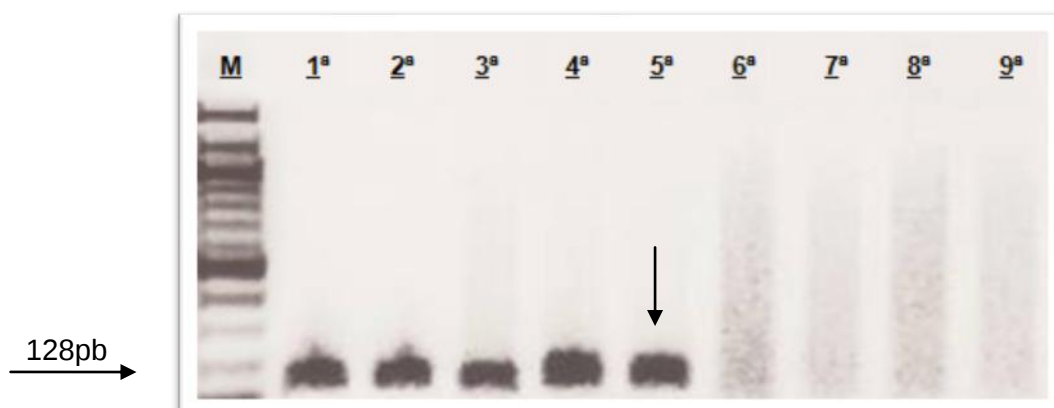
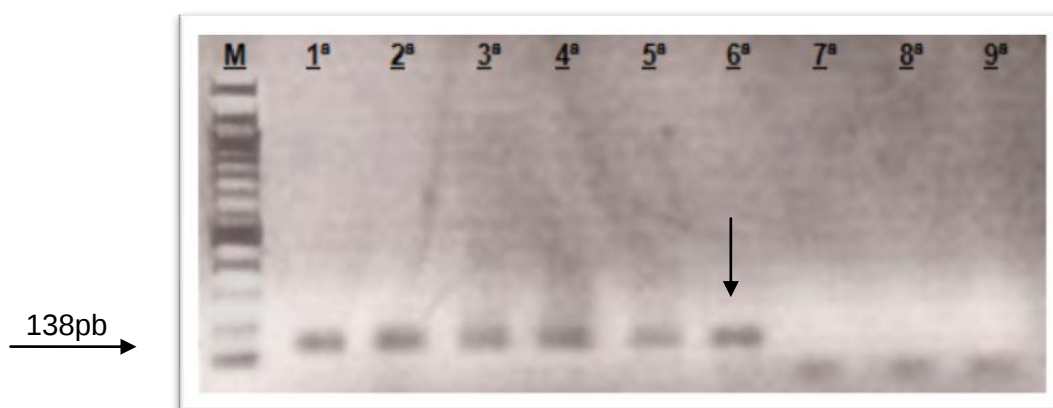
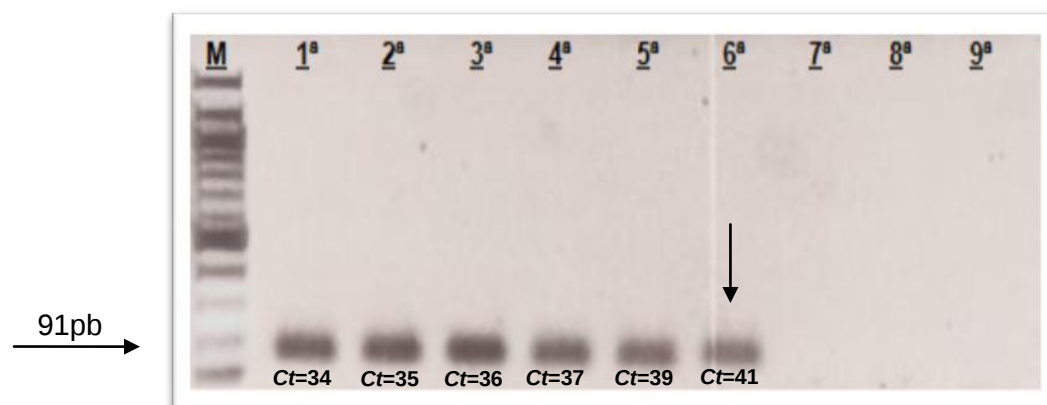
a) Linhagem BBF: *n*-PCR (*tax*)**b) Linhagem BBF: *n*-PCR (*pol*)****c) Linhagem BBF: PCR em tempo real (*pol*)**

Figura 11: Produtos de amplificação da *n*-PCR (*tax* e *pol*) e da PCR em tempo real (*pol*) obtidos a partir de diluições seriadas de DNA da linhagem celular infectada com HTLV-2 (BBF), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Legenda: M: DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen); 1^a a 9^a (concentrações de DNA 1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg). As setas à esquerda indicam o tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb) e as setas na posição vertical, o limite de detecção do produto amplificado nas PCRs.

A **Figura 12** mostra as curvas de emissão de fluorescência obtidas pelos produtos amplificados na PCR em tempo real da linhagem BBF infectada por HTLV-2, de acordo com as diluições de DNA.

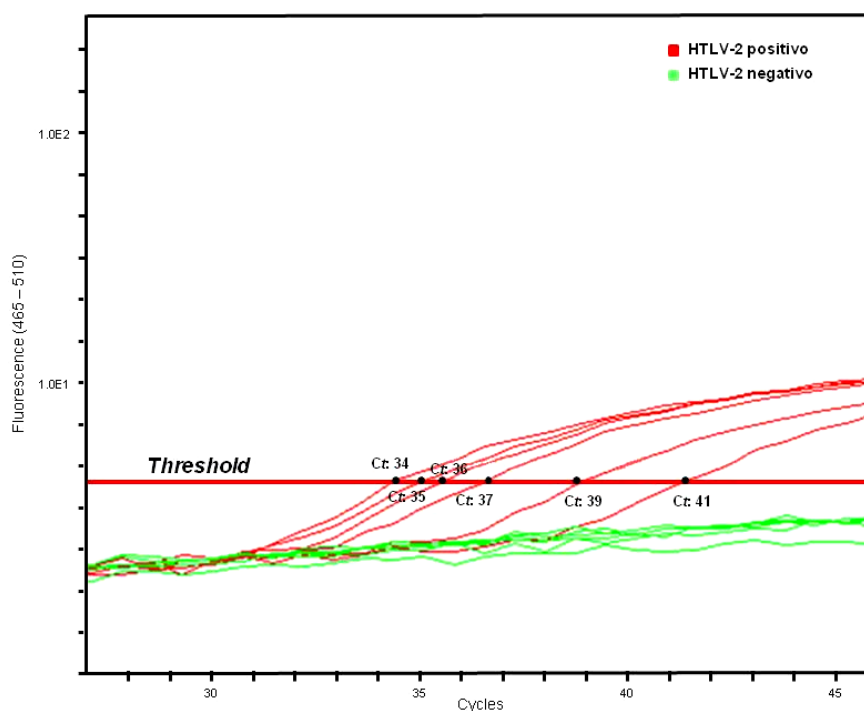


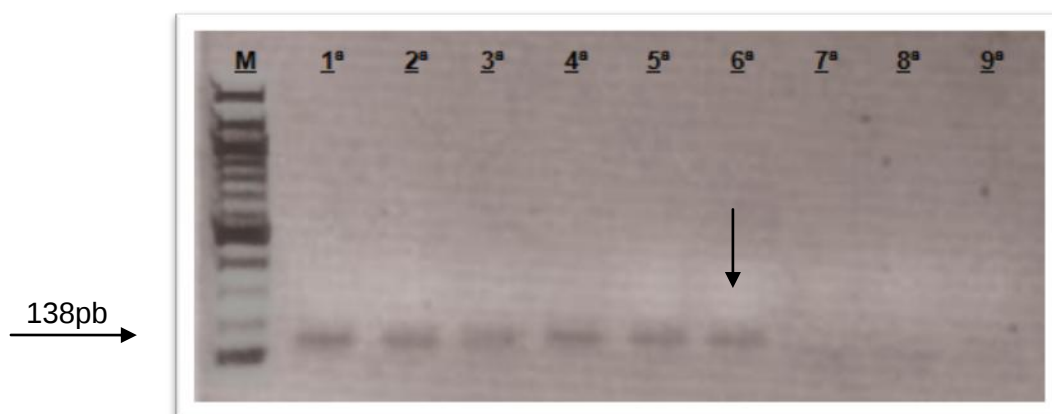
Figura 12: Número de ciclos (*cycle threshold*) necessários para resultar numa PCR em tempo real *pol* positiva em amostras de DNA obtidas de linhagem celular infectada por HTLV-2 (BBF), usando diluições seriadas de DNA (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg).

Legenda: *Threshold*: valor de fluorescência ideal para discriminar uma amostra positiva de uma negativa na PCR em tempo real; *Ct*: *cycle threshold*.

Apesar da PCR em tempo real (*pol*) para HTLV-2 ter sido 10X mais sensível do que a PCR em tempo real (*pol*) para HTLV-1 (**Tabela 2**), as curvas de fluorescência de HTLV-2 não mostraram o padrão esperado (**Figura 12**). Para verificar se isto era devido à infecção por HTLV-2 ou à

linhagem celular utilizada, foi realizada PCR em tempo real para albumina na linhagem BBF, e PCR em tempo real (*pol*) em algumas amostras de DNA sabidamente positivas para HTLV-2 (Dissertação de Mestrado de Morimoto, 2003; dados não apresentados). Os resultados obtidos confirmaram problemas com a linhagem celular BBF (albumina positiva apenas até a terceira diluição do DNA) e curvas de emissão de fluorescência sigmóides com as amostras clínicas. Assim a linhagem BBF foi substituída por uma amostra HTLV-2 positiva (CP-2) com o mesmo limite de detecção de DNA alvo (1000 pg) [Figuras 13 (a e b) e 14].

a) CP-2: *n*-PCR (*pol*)



b) CP-2: PCR em tempo real (*pol*)

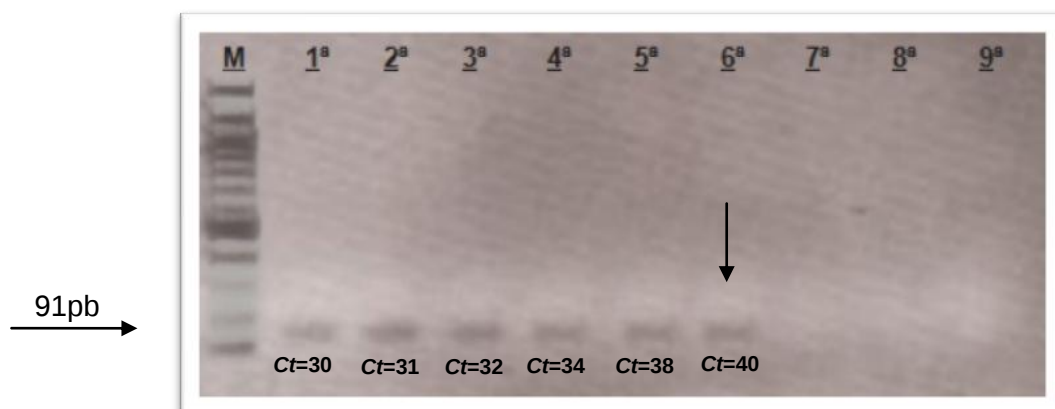


Figura 13: Produtos de amplificação da *n*-PCR (*pol*) e da PCR em tempo real (*pol*) obtidos a partir de diluições seriadas de DNA da amostra CP-2, submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Legenda: M: DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen); 1^a a 9^a (concentrações de DNA 1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg). As setas à esquerda indicam o tamanho do produto amplificado em pares de bases (pb) e as setas na posição vertical, o limite de detecção do produto amplificado nas PCRs.

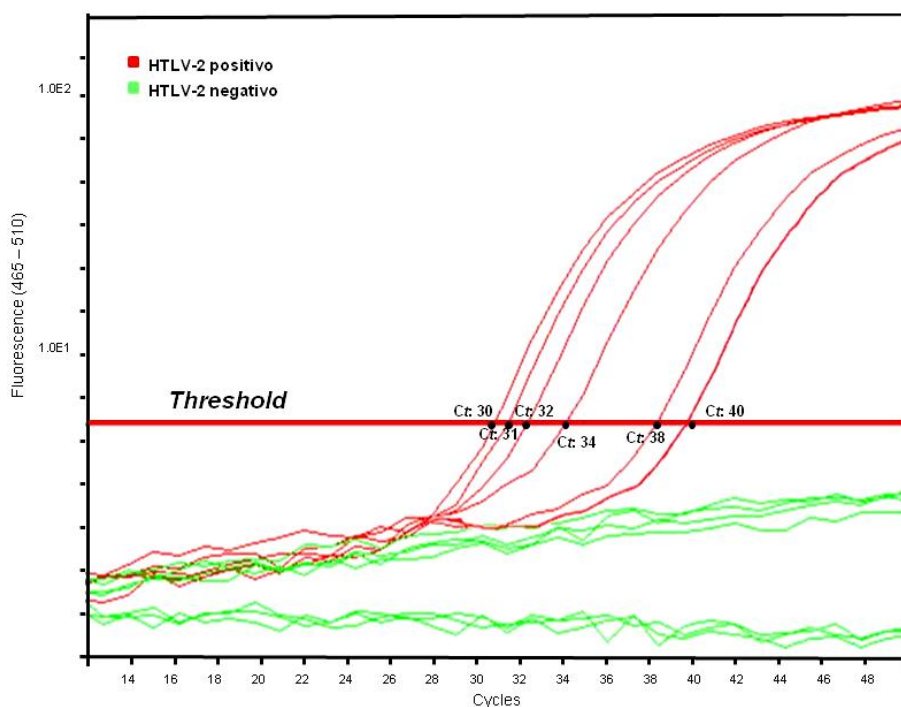


Figura 14: Número de ciclos (*cycle threshold*) necessários para resultar numa PCR em tempo real *pol* positiva, usando diluições seriadas de DNA da amostra CP-2 (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg).

Legenda: *Threshold*: valor de fluorescência ideal para discriminar uma amostra positiva de uma negativa na PCR em tempo real; *Ct*: *cycle threshold*.

As **Figuras 15 e 16** mostram a sensibilidade da reação de PCR em tempo real para o segmento de DNA da albumina humana que foi de 10 pg de DNA alvo (8^a diluição).

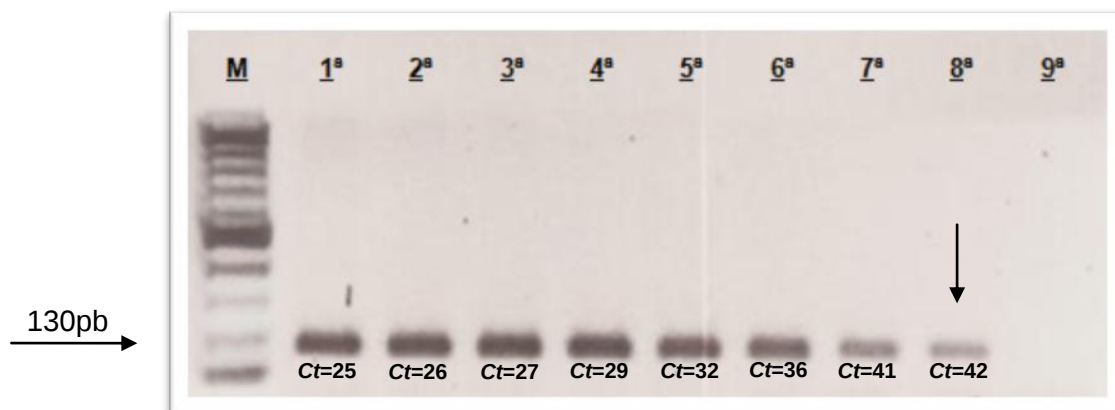


Figura 15: Produtos de amplificação da PCR em tempo real para albumina humana obtidos a partir de diluições seriadas de DNA de amostra negativa para HTLV-1/2 (CN-1), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Legenda: M: DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen); 1^a a 9^a (concentrações de DNA 1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg). A seta na posição vertical indica o limite de detecção do produto amplificado na PCR.

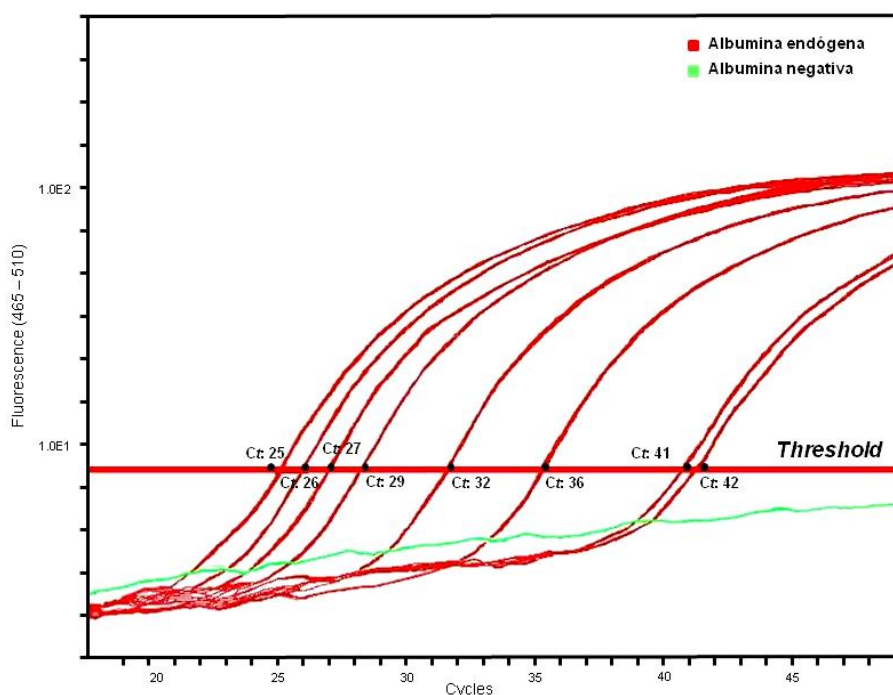


Figura 16: Número de ciclos (*cycle threshold*) necessários para resultar numa PCR em tempo real positiva para o gene da albumina humana em amostra HTLV-soronegativa, usando diluições seriadas de DNA (1000, 500, 250, 100 e 10 ng e 1000, 100, 10 e 1 pg).

Legenda: *Threshold*: valor de fluorescência ideal para discriminar uma amostra positiva de uma negativa na PCR em tempo real; *Ct*: *cycle threshold*.

A análise de regressão linear das curvas de diluição dos DNAs em relação aos valores de *Ct* das PCRs em tempo real mostrou melhor eficiência de amplificação na linhagem C91/PL infectada por HTLV-1 ($R^2 > 0,995$) (**Figura 17**).

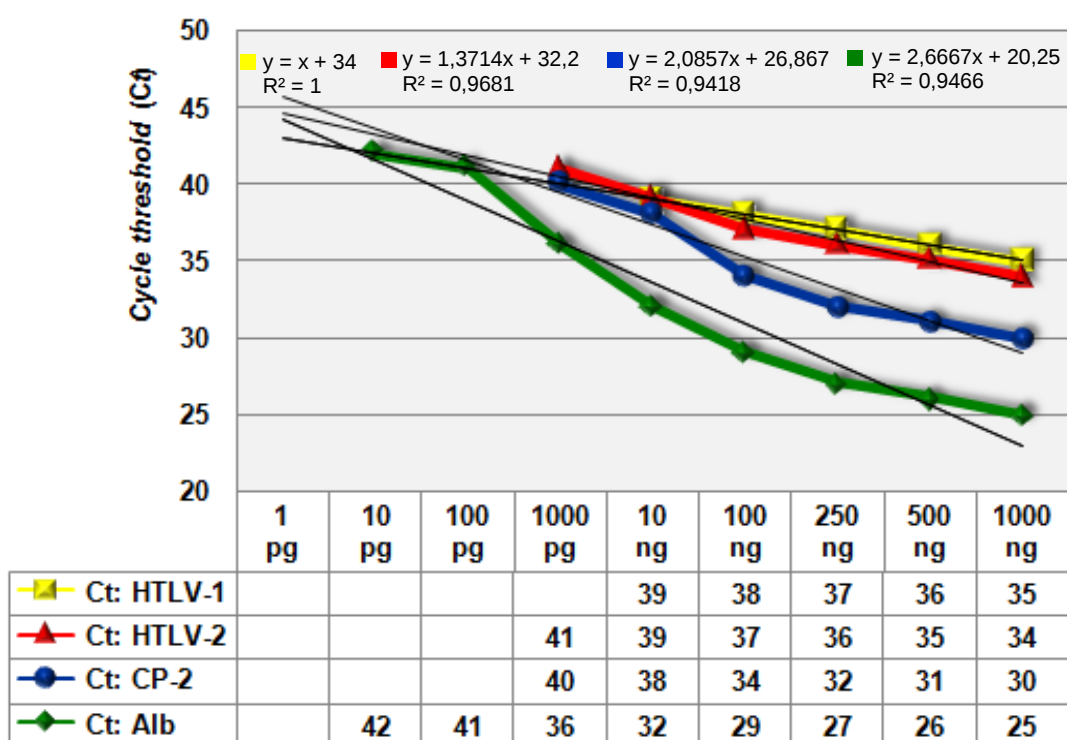


Figura 17: Curvas de valores de *Ct* obtidas pela PCR em tempo real a partir de diluições seriadas dos DNAs extraídos das linhagens celulares C91/PL e BBF e de amostras controle positivo para HTLV-2 (CP-2) e endógeno de reação (albumina, CN-1).

Legenda: y : equação da análise de regressão linear; R^2 : coeficiente de correlação linear; No eixo da abcissa estão dispostas as concentrações finais do DNA e na ordenada os valores de *cycle threshold* (*Ct*).

4.3.2. Aplicação da PCR convencional (*tax* e *pol*) e da PCR em tempo real (*pol*) na rotina diagnóstica do IAL

Os testes moleculares foram feitos pelo menos em duplicata e das 73 amostras de sangue previamente submetidas à confirmação sorológica pelo WB, 41 resultaram positivas na PCR convencional (*tax* e *pol*) e 42 na PCR em tempo real (*pol*). Os resultados obtidos com os três testes confirmatórios são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Resultados obtidos pelas técnicas de PCR convencional (*tax* e *pol*) e em tempo real (*pol*) empregadas no diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em 73 amostras previamente submetidas à confirmação sorológica pela técnica de WB (2007 a 2010).

WB		PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>)			PCR em tempo real (<i>pol</i>)		
Resultados	n	HTLV-1	HTLV-2	Negativo	HTLV-1	HTLV-2	Negativo
HTLV-1	24	20		4	20		4
HTLV-2	21		15	6		15	6
HTLV não tipado	3	1	1	1	1	1	1
Indeterminado	16	1	3	12	1	4	11
Negativo	9			9			9
TOTAL	73	22	19	32	22	20	31
Amostras positivas	48 (65,75%)	41 (56,16%)			42 (57,53%)		

Legenda: WB: HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics; n: número de amostras de sangue testadas.

A **Figura 18** mostra os padrões de eletroforese dos produtos da *n*-PCR (*tax* e *pol*) de amostras representativas da rotina diagnóstica do IAL.

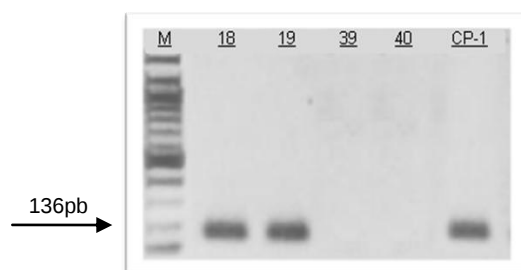
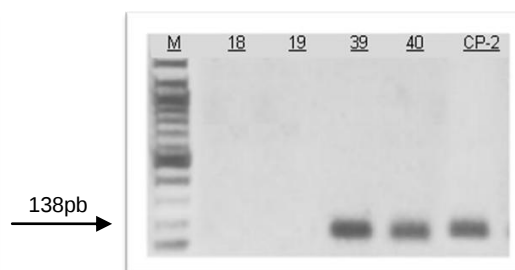
a) *n*-PCR (*tax*)**b) *n*-PCR para HTLV-1 (*pol*)****c) *n*-PCR para HTLV-2 (*pol*)**

Figura 18: Produtos de amplificação da *n*-PCR (*tax* e *pol*) obtidos em amostras representativas da rotina diagnóstica do IAL (2007 a 2010), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Legenda: M: DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen); CN: controle negativo para HTLV-1/2; CP-1: controle positivo para HTLV-1; CP-2: controle positivo para HTLV-2. Os números localizados na parte superior das figuras representam a identificação das amostras analisadas. As setas à esquerda indicam os tamanhos dos produtos amplificados em pares de bases.

A **Figura 19** mostra os padrões de eletroforese dos produtos da *n*-PCR (*tax*) submetidos ou não à ação da enzima *Taq* I. Dos 41 produtos amplificados, 22 foram classificados como HTLV-1 (presença da banda de 128pb, antes e após a digestão) e 19 HTLV-2 (banda de 69/53pb, após a digestão enzimática).

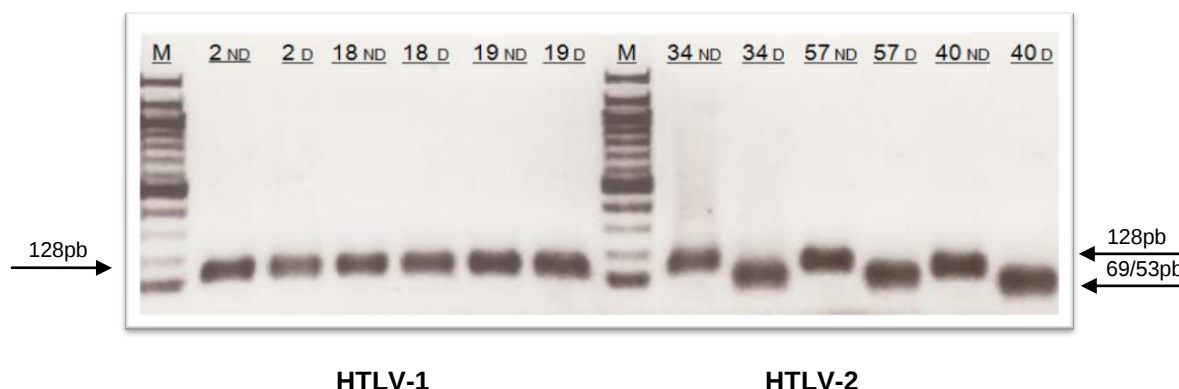


Figura 19: Amostras representativas do padrão eletroforético da PCR-RFLP de produtos de amplificação da *n*-PCR (*tax*) antes e após a digestão pela enzima *Taq* I em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Legenda: M: DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen); ND: produto não digerido; D: produto digerido. Os números localizados na parte superior das figuras representam a identificação das amostras analisadas. As setas à esquerda e à direita indicam os tamanhos dos produtos amplificados e digeridos em pares de bases.

Os resultados apresentados pela PCR em tempo real (*pol*) confirmaram os obtidos pela PCR convencional (*tax* e *pol*), além de detectar mais uma amostra HTLV-2 positiva (IAL-56). Nas 22 amostras positivas para HTLV-1, os valores de *Ct* obtidos na PCR em tempo real (*pol*) variaram de 27 a 41, com média de *Ct* = 34; e para os casos positivos para HTLV-2 o *Ct* variou de 29 a 40, com média de *Ct* = 35. Para HTLV-1 o valor de *Ct* mais freqüentemente detectado foi igual a 36, enquanto para HTLV-2 foi 35 e 36.

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos na PCR em tempo real (*pol* e albumina) em valores de *Ct*, confirmando boa qualidade do DNA extraído (todas as amostras positivas para o gene da albumina humana, com *Ct* variando de 22 a 36, com média de *Ct* = 27).

Tabela 4: Valores de *Ct* obtidos nas 42 amostras HTLV-soropositivas da rotina diagnóstica do IAL ao serem submetidas à PCR em tempo real (*pol*) para confirmação e tipagem molecular.

PCR em tempo real							
ID amostra	HTLV-1 positivo (n=22)			ID amostra	HTLV-2 positivo (n=20)		
	HTLV-1 (Ct)	HTLV-2 (Ct)	Albumina (Ct)		HTLV-1 (Ct)	HTLV-2 (Ct)	Albumina (Ct)
IAL-23	27	0	22	IAL-46	0	29	22
IAL-27	27	0	22	IAL-48	0	29	23
IAL-22	28	0	21	IAL-45	0	30	22
IAL-12	29	0	24	IAL-40	0	31	26
IAL-13	29	0	24	IAL-44	0	32	23
IAL-26	29	0	22	IAL-34	0	33	26
IAL-25	30	0	24	IAL-28	0	34	27
IAL-14	32	0	25	IAL-59	0	34	28
IAL-10	32	0	26	IAL-31	0	35	27
IAL-5	33	0	28	IAL-39	0	35	31
IAL-24	33	0	22	IAL-47	0	35	23
IAL-18	34	0	29	IAL-54	0	35	26
IAL-19	35	0	27	IAL-1	0	36	26
IAL-8	36	0	27	IAL-37	0	36	33
IAL-17	36	0	30	IAL-38	0	36	30
IAL-64	36	0	31	IAL-41	0	36	25
IAL-21	36	0	36	IAL-29	0	37	27
IAL-16	37	0	35	IAL-57	0	38	34
IAL-2	40	0	25	IAL-30	0	39	30
IAL-4	40	0	26	IAL-56	0	40	26
IAL-6	41	0	29				
IAL-11	41	0	32				
MÉDIA	34		27	MÉDIA		35	27

Legenda: *Ct*: cycle threshold; *Ct* = 0 (indetectável). O valor de *Ct* corresponde ao número do ciclo o qual a reação de amplificação cruza o *threshold* na PCR em tempo real.

A **Figura 20** mostra as curvas de amplificação obtidas em uma placa de PCR em tempo real (*pol* e albumina) em que amostras representativas positivas para HTLV-1 são apresentadas em azul, para HTLV-2 em amarelo e para albumina humana em vermelho.

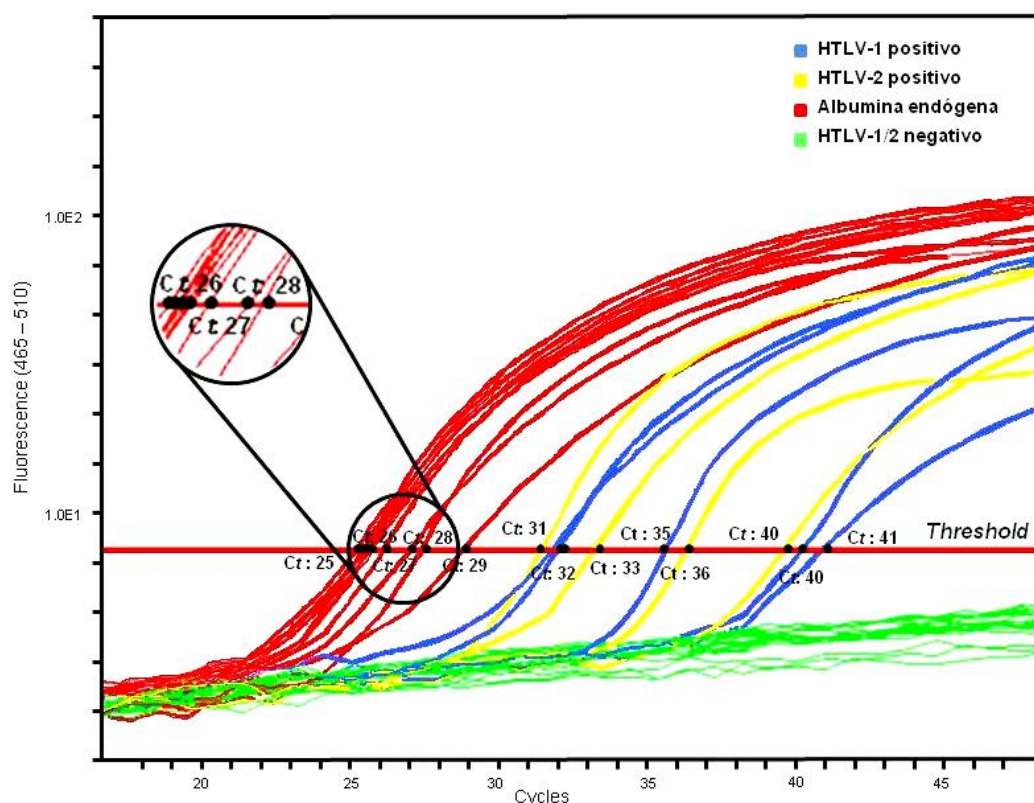
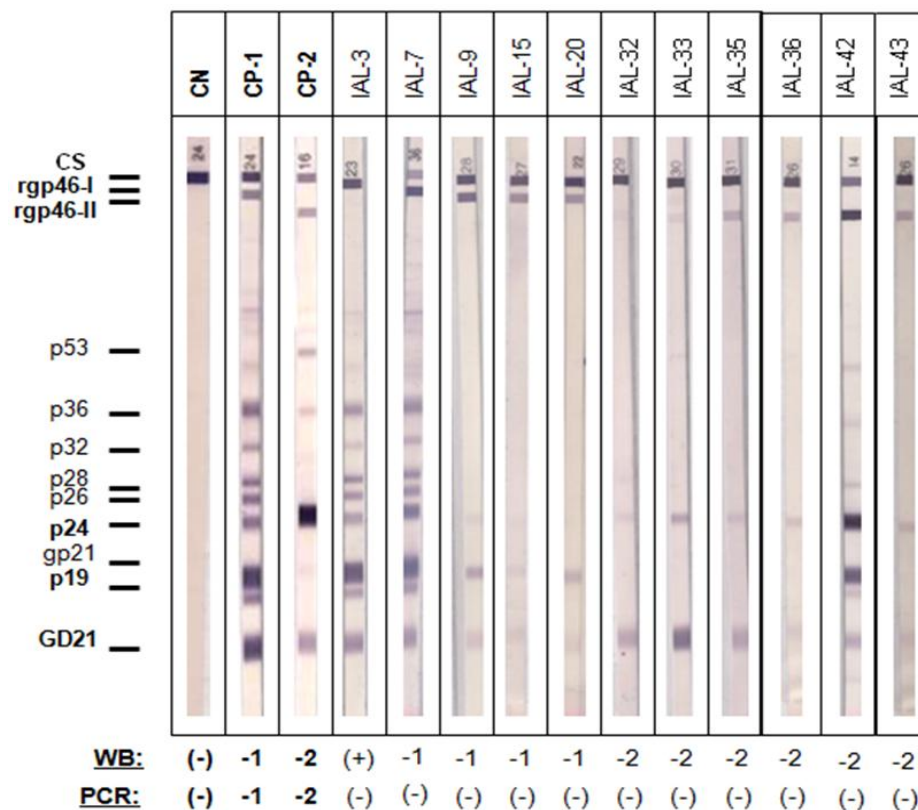


Figura 20: Curvas de amplificação obtidas na PCR em tempo real (*pol* e albumina) em amostras representativas positivas e negativas para HTLV-1/2 encaminhadas ao IAL (2007 a 2010).

Legenda: *Threshold*: valor de fluorescência ideal para discriminar uma amostra positiva de uma negativa na PCR em tempo real; *Ct*: cycle threshold.

Em resumo, foram encontrados 16 casos discordantes entre os testes confirmatórios: sorológico e moleculares. Destes, 11 amostras resultaram WB positivas e seus perfis de anticorpos são apresentados na **Figura 21 (a)**. Já duas amostras com padrão HTLV não tipado e cinco indeterminadas no WB e que resultaram PCRs positivas são apresentadas na **Figura 21 (b)**.

a) 11 amostras positivas pelo WB e negativas pelas PCRs



b) 2 amostras HTLV não tipado e 5 indeterminadas no WB que foram PCRs positivas

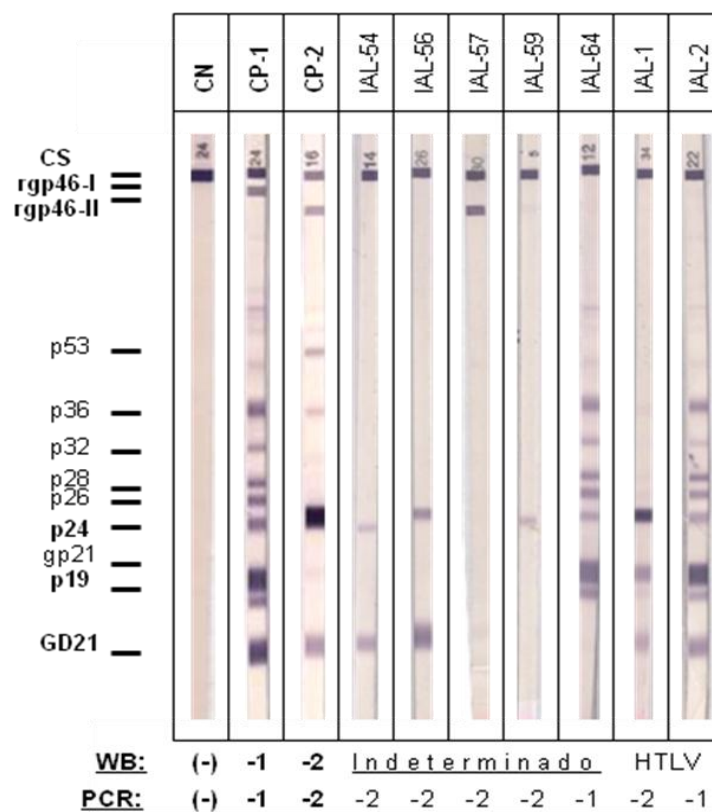


Figura 21: Resultados e perfis de bandas obtidos pelo WB em amostras submetidas às PCRs convencionais (*tax* e *pol*) e em tempo real (*pol*) que obtiveram resultados discordantes entre os testes confirmatórios (sorológico e moleculares).

Legenda: CN: controle negativo para HTLV; CP-1: controle positivo para HTLV-1; CP-2: controle positivo para HTLV-2; CS: controle do soro; PCR: convencional e/ou em tempo real (*tax* e *pol*); (-): negativo para HTLV-1/2; -1: positivo para HTLV-1; HTLV-2: positivo para HTLV-2. Os números localizados na parte superior das figuras representam a identificação das amostras analisadas.

A **Tabela 5** mostra estes resultados, ressaltando os valores de *Ct* obtidos na PCR em tempo real (*pol*), e confirmando a presença de DNA de boa qualidade nas amostras que resultaram PCR negativas (todas albumina humana positivas).

Tabela 5: Resultados comparativos das 16 amostras positivas para HTLV-1/2 que apresentaram resultados discordantes entre o WB e/ou a PCR convencional (*tax* e *pol*) e/ou a PCR em tempo real (*pol*).

Amostra (n=16)	WB	PCR	PCR em tempo real			
	Resultado	<i>tax</i> e <i>pol</i>	<i>pol</i>	-1	-2	Alb
IAL-3	HTLV	-	-	0	0	28
IAL-7	HTLV-1	-	-	0	0	28
IAL-9	HTLV-1	-	-	0	0	32
IAL-15	HTLV-1	-	-	0	0	31
IAL-20	HTLV-1	-	-	0	0	32
IAL-32	HTLV-2	-	-	0	0	27
IAL-33	HTLV-2	-	-	0	0	31
IAL-35	HTLV-2	-	-	0	0	26
IAL-36	HTLV-2	-	-	0	0	31
IAL-42	HTLV-2	-	-	0	0	27
IAL-43	HTLV-2	-	-	0	0	26
IAL-1	HTLV	HTLV-2	HTLV-2	0	36	26
IAL-2	HTLV	HTLV-1	HTLV-1	40	0	25
IAL-54	Ind. (GD21, p24)	HTLV-2	HTLV-2	0	35	26
IAL-56	Ind. (GD21, p24)	-	HTLV-2	0	40	26
IAL-57	Ind. (GD21, rgp46-II)	HTLV-2	HTLV-2	0	38	34
IAL-59	Ind. (p24, rgp46-II)	HTLV-2	HTLV-2	0	34	28
IAL-64	Ind. (p19,p24,p26,p28,p32,p36,gp46,p53)	HTLV-1	HTLV-1	36	0	31

Legenda: WB: HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics; PCR: PCR convencional (*tax* e *pol*); PCR em tempo real (*pol*); (-): negativo; Ind.: Indeterminado; n: número de amostras; *Ct*: cycle threshold; *Ct* = 0: *Ct* indetectável; -1: *Ct* da reação para detectar HTLV-1; HTLV-2: *Ct* para HTLV-2; Alb: *Ct* para albumina.

Em conclusão, 53 (72,60%) das 73 amostras analisadas foram positivas em pelo menos um dos testes confirmatórios: 48 (90,56%) detectadas pelo WB, 41 (77,36%) pela PCR convencional (*tax* e *pol*) e 42 (79,25%) pela PCR em tempo real (*pol*), conforme a **Figura 22**.

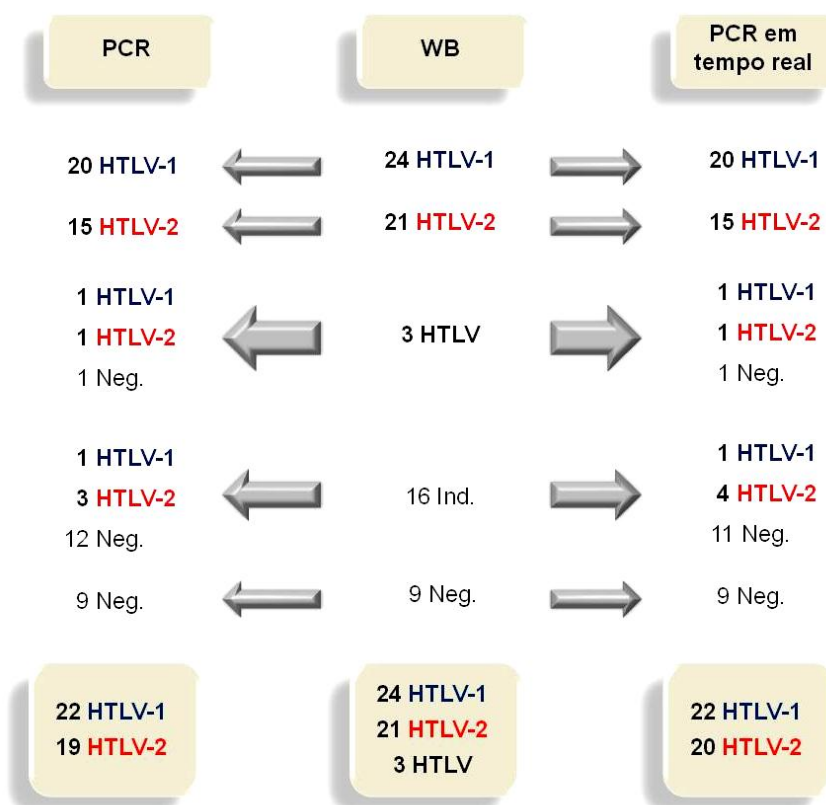


Figura 22: Representação esquemática da síntese dos resultados obtidos pelos testes confirmatórios (sorológico e moleculares) empregados no diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em 73 amostras de sangue encaminhadas ao IAL para análise (2007 a 2010).

Legenda: WB: HTLV Blot 2.4, Genelabs® Diagnostics; PCR: PCR convencional (*tax* e *pol*); PCR em tempo real (*pol*); HTLV: HTLV positivo, mas não tipado; Ind.: Indeterminado; Neg.: negativo.

Embora estes resultados apontem para maior sensibilidade do WB em relação aos testes moleculares, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados do WB e PCR convencional ($p=0,064$) e WB e PCR em tempo real ($p=0,104$).

De acordo com o gênero e idade dos pacientes, apesar do número de casos confirmadamente positivos para a infecção por HTLV-1/2 ser semelhante entre os gêneros masculino e feminino, com idade média de 44 e 42 anos, respectivamente, houve mais homens infectados pelo HTLV-2 e mais mulheres infectadas pelo HTLV-1, embora sem significância estatística ($p=0,072$ para HTLV-1 e $p=0,132$ para HTLV-2) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Distribuição do número de amostras positivas ($n=53$) e indeterminadas ($n=16$) para HTLV-1/2, segundo faixa etária e gênero dos pacientes.

Faixa etária (anos)	Gênero							
	Masculino				Feminino			
	HTLV-1	HTLV-2	HTLV	Ind.	HTLV-1	HTLV-2	HTLV	Ind.
20 - 29		2		1	1	1		2
30 - 39	2	3		2	3	5		2
40 - 49	4	7		3	9	3		1
≥ 50	3	3	1	2	4	2		3
Total (Média de idade)	9 (46)	15 (43)	1 (62)	8 (43)	17 (42)	11 (42)	0	8 (42)

Legenda: HTLV: HTLV positivo, mas não tipado; Ind.: Indeterminado.

A Tabela completa com todos os resultados obtidos nas 73 amostras testadas pelos ensaios confirmatórios sorológico e moleculares encontram-se no **Anexo 6**.

Considerando que nenhum teste confirmatório utilizado isoladamente tenha sido 100% sensível para detectar todos os casos verdadeiramente positivos para a infecção por HTLV-1/2, torna-se necessário que sejam usados em conjunto. Para avaliar qual o melhor algoritmo de testes confirmatórios foi feita uma estimativa de custo-benefício destes ensaios (**Tabela 7**).

Tabela 7: Comparação das características operacionais e dos indicadores de desempenho dos testes confirmatórios de WB, PCR convencional (*tax* e *pol*) e PCR em tempo real (*pol*) empregados no diagnóstico confirmatório da infecção por HTLV-1/2.

Parâmetros	Western blot	PCR convencional (<i>tax</i> e <i>pol</i>)	PCR em tempo real (<i>pol</i>)
Nº de agentes pesquisados	2 agentes (HTLV-1, HTLV-2)	2 agentes (HTLV-1, HTLV-2)	2 agentes (HTLV-1, HTLV-2)
Controle de reação	imunoglobulina	albumina	albumina
Limiar de detecção		<i>pol</i> : 1000pg de DNA alvo	<i>pol</i> : 1000pg de DNA alvo
Resultados	Qualitativos	Qualitativos	Semi-quantitativos
Quantificação de:	Anticorpos: não permite	DNA: não permite	DNA: permite
Interpretação dos resultados	Baseado na observação de bandas em tira de nitrocelulose	Baseado na observação de bandas em gel de agarose	Baseado em valores de Ct determinados pelo software
Geração de resíduos tóxicos	Não	Sim, caso seja usado o corante brometo de etídio	Não
Equipamentos necessários	Plataforma oscilante Equipamento compressor	Termociclador Sistema de eletroforese Sistema de fotodocumentação	Automação para PCR em tempo real (amplificação e detecção simultânea)
Tempo de reação	4 h	12 h	3 h
Tempo para o resultado final	5 h	32 h	4 h
Honorários técnicos*	R\$ 125,00	R\$ 800,00	R\$ 100,00
Rendimento:	1 tira por amostra	1 gel: 20 amostras + 6 controles + 2 marcadores de peso molecular	1 placa: 30 amostras + 3 controles + 3 NTC
Custo por testes	R\$ 250,00	<i>tax</i> : R\$ 27,39 <i>pol</i> : R\$ 23,39	R\$ 42,38
Limitações do método em população de risco	16/73 (21,92%) indeterminados	12/53 (22,64%) falso negativas	11/53 (20,75%) falso negativas

Legenda: (*): R\$ 25,00/hora; NTC: *no template control* (controle de contaminação do laboratório)

Fonte: Adaptado de Sacchi, 2007.

Tomando como base esta estimativa, talvez o mais adequado fosse inicialmente submeter as amostras de sangue à confirmação molecular pela PCR em tempo real, e nos casos negativos, realizar o ensaio de WB. Ao adotar esta seqüência de exames na casuística deste estudo, haveria redução de 44,21% no custo do diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 (Tabela 8).

Tabela 8: Levantamento de custos de ensaios confirmatórios adotando o Algoritmo IAL 2007 (2ª etapa) e o Algoritmo IAL 2010 com 73 amostras de sangue analisadas.

Algoritmo IAL 2007 (2ª etapa)		Algoritmo IAL 2010	
Teste	Custo	Teste	Custo
1. WB 2.4 (n=73)	R\$ 18.250,00	1. PCR em tempo real (n=73)	R\$ 3.093,81
2. PCR em tempo real (n=28)	R\$ 1.186,64	2. WB 2.4 (n=31)	R\$ 7.750,00
Custo final	R\$ 19.436,64		R\$ 10.843,81

Legenda: **Algoritmo IAL 2007 (2ª etapa):** 1º teste confirmatório (WB) em 73 amostras. As amostras HTLV positivas, mas não tipadas, indeterminadas e negativas seriam submetidas ao teste suplementar de PCR em tempo real (n=28). **Algoritmo IAL 2010:** 1º teste confirmatório (PCR em tempo real) em 73 amostras. As amostras negativas seriam submetidas ao teste suplementar de WB (n=31).

O Algoritmo IAL 2010 a ser validado e implantado encontra-se na **Figura 23.**

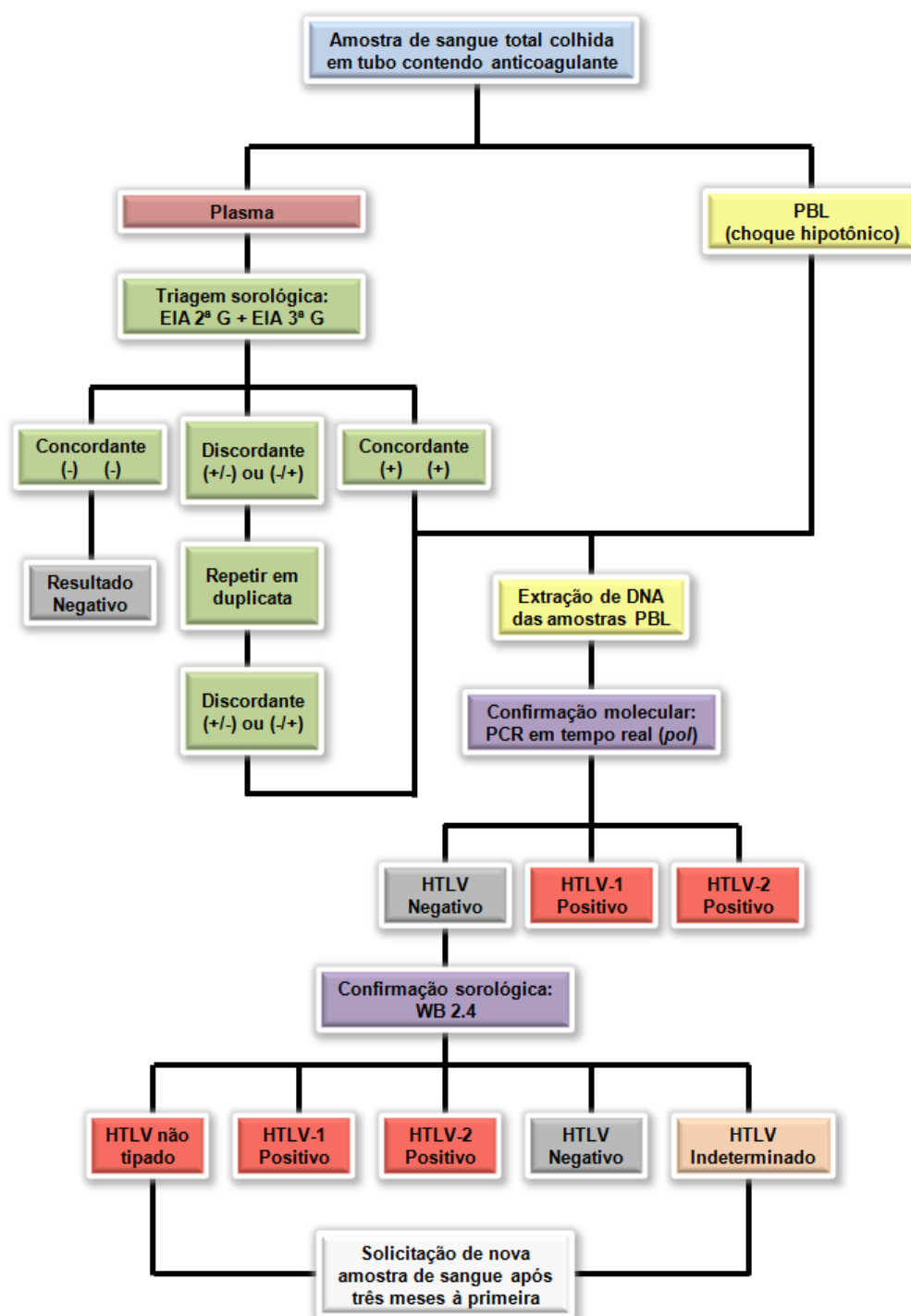


Figura 23: Algoritmo de testes laboratoriais para ser validado pelo IAL na investigação de infecção por HTLV-1/2 em população de risco (Algoritmo IAL 2010).

Legenda: (+): reagente; (-): não reagente; EIA: ensaio imunoenzimático; EIA 2ª G: EIA de segunda geração; EIA 3ª G: EIA de terceira geração; PBL: leucócitos do sangue periférico; WB: Western blot; PCR: reação em cadeia da polimerase.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou a busca do melhor algoritmo de testes laboratoriais a ser utilizado no diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em casuística de risco encaminhada ao IAL para análise. No ano de 2007 foi relatado que havia necessidade de se utilizarem dois EIAs na triagem sorológica para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2, pois nenhum EIA disponível no comércio havia sido capaz de detectar todos os soros verdadeiramente positivos (WB) para estas infecções virais (Jacob, 2007; Jacob et al., 2007). Esses resultados foram confirmados recentemente na Monografia PIBIC de Dall'Agnol (2010), e apontaram ainda para a necessidade de se realizar a triagem sorológica em duplicata, principalmente quando for empregado apenas um EIA.

Curiosamente, uma análise detalhada dos resultados dos EIAs da rotina do IAL dos anos de 1998 a 2006 revelou que os EIAs de 3ª geração foram mais sensíveis, porém menos específicos que os de 2ª geração. No entanto, os EIAs de 2ª geração se mostraram mais eficientes (Jacob, 2007; Jacob et al., 2007; 2008a; 2008b). Para melhor compreender esses resultados foi usado no presente estudo a análise ROC. Esta ferramenta de trabalho vem sendo usada para ajustar o valor do *cut-off* de reações para o ponto onde há maior sensibilidade e menor número de resultados falso negativos, considerando que aumentando a sensibilidade há diminuição da especificidade do teste (Fujiyama et al., 1995; Beck et al., 1996; Carminati et al., 2003; Martinez et al., 2003; Souza, 2008; Beck et al., 2009). Quando empregada neste estudo, a análise ROC ajustou o valor de DO/*cut-off* dos EIAs de 3ª geração para 2,1 (preconizado pelo fabricante DO/*cut-off* = 1,0) o que aumentou a especificidade em 7,8%, passando de 87,4% para 95,2% e reduziu a sensibilidade em 0,1% (perda de dois casos) (Jacob et al., 2009, **Anexo 4**).

Ajustes no valor do *cut-off* de EIAs anti-HTLV-1/2 foram propostos há muitos anos por outros pesquisadores. Em 1993 na Austrália, Karopoulos

et al. compararam o desempenho de nove *kits* comerciais para triagem sorológica de infecção por HTLV-1 (oito EIAs e um PA) usando um painel de soros bem caracterizados como positivos e negativos por WB e RIPA. Encontraram dificuldades em identificar corretamente soros verdadeiramente negativos para HTLV-1 com quatro EIAs. Da mesma forma, Fujiyama et al. (1995) no Japão avaliaram nove EIAs e um PA quanto a sensibilidade e especificidade usando um painel de soros caracterizados como positivos e negativos para HTLV-1 por IFI e PCR. Atribuíram resultados falso positivos nos EIAs a um valor de *cut-off* inadequado e ao uso de proteínas recombinantes na composição desses EIAs. Sugeriram que alguns EIAs deveriam ser otimizados para aumentar sua especificidade.

Beck et al. (1996) realizaram o primeiro estudo no Brasil para comparar a acurácia de testes de triagem anti-HTLV disponíveis no mercado. Estes pesquisadores usaram soros brasileiros como painel de referência e verificaram problemas na identificação de soros HTLV negativos. Usando a análise ROC, observaram que alguns EIAs necessitavam de ajustes no valor do *cut-off*, enquanto outros não (semelhante ao observado no presente estudo). Comentaram que estes resultados poderiam estar relacionados a regiões geográficas onde o teste era utilizado (países tropicais onde há estimulação policlonal de linfócitos B devido a infecções parasitárias, por exemplo).

Em estudo da Fundação de Hemoterapia do Pará (HEMOPA), a triagem sorológica para HTLV-1/2 foi realizada em duplicata com EIA de 3ª geração, e foram considerados reagentes os soros que resultaram em DO acima de 20% do valor do *cut-off* da reação (Tamegão-Lopes et al., 2006). Critério semelhante foi adotado em estudo conduzido na Paraíba com lactantes (Pimenta et al., 2008).

Em Moçambique, Gudo et al. (2008) utilizaram um algoritmo de dois EIAs sequenciais na triagem de doadores de sangue. Foram submetidos ao teste confirmatório de WB apenas os soros reagentes nos dois EIAs e os soros reagentes em um EIA com DO/*Cut-off* acima de 2,0.

Portanto, o valor de *cut-off* dos EIAs para detectar infecção por HTLVs deve levar em consideração o local de realização do ensaio e a população de estudo.

Embora não exista legislação que permita alterar o valor do *cut-off* estabelecido pelo fabricante do *kit* EIA, trabalhos realizados em Laboratórios de Referência como o IAL podem fornecer subsídios para se acrescentar no rodapé do laudo do exame os seguintes dizeres: “Amostras com valores de DO/*Cut-off* variando de 1,0 a 2,1 devem ser consideradas reagentes com reservas” (Jacob et al., 2009); “A amostra só será considerada positiva para a infecção por HTLV-1/2 após a confirmação por WB e/ou PCR”.

Em relação ao melhor algoritmo de testes de triagem e confirmatórios para ser usado no IAL, Jacob et al. (2007) propuseram um algoritmo de coleta de duas amostras de sangue sequenciais. A primeira para triagem sorológica e a segunda para repetição da triagem e confirmação de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 utilizando teste sorológico (WB) e molecular (PCR). A análise preliminar realizada com 313 pacientes mostrou falha na implantação do algoritmo, tendo em vista que 75% dos pacientes cujos soros resultaram reagentes em pelo menos um EIA na triagem e que deveriam ter retornado para nova coleta de sangue em tubo contendo anticoagulante, não o fizeram (Costa et al., 2009, **Anexo 5**). Vários fatores podem ter contribuído para o fracasso na implantação deste algoritmo como falta de entrosamento entre laboratório, unidade solicitante, médico e paciente; demora na liberação e recebimento do resultado da triagem; falta de informação e interesse dos profissionais de saúde quanto à nova coleta de sangue; falta de informação dada ao paciente; abandono por parte do paciente por falta de recursos financeiros, entre outros. Incontestável é que em serviços públicos de saúde, algoritmos simples de coleta única de sangue são os mais apropriados. Embora algoritmo de duas coletas de sangue seja o preconizado pelo MS para o diagnóstico de HIV (Brasil, 2005), para HTLV-1/2 ele se mostrou inexequível.

No entanto, um estudo conduzido no pré-natal com gestantes do Mato Grosso do Sul empregou a coleta dupla de sangue, sendo a primeira

por punção digital (utilizada na triagem sorológica) e a segunda em tubo contendo anticoagulante (para repetição da triagem sorológica e confirmação por WB e PCR) (Dal Fabbro et al., 2008).

Devido à falha na implantação do Algoritmo IAL 2007, este foi abandonado e substituído por algoritmo de coleta única em tubo contendo anticoagulante. Com ele, houve aumento no encaminhamento de sangue coletado corretamente que passou de 45% no final de 2009 a 90% em agosto de 2010. No entanto, a quantidade e a qualidade das amostras de sangue enviadas ao IAL permaneceram variáveis. Foram observadas: • diferenças de volume (de 2 a 5 mL de sangue no tubo contendo anticoagulante); • armazenamento inadequado sob refrigeração ou por vários dias no local de coleta do sangue (Unidade de Saúde solicitante); • hemólise do material coletado, entre outros. Estas variáveis detectadas na fase pré-analítica dos ensaios sorológicos e moleculares foram apontadas por diversos pesquisadores como causas de resultados falsos que podem interferir na avaliação da eficácia desses ensaios (Sacchi et al., 2006). De fato, isto pode ter ocorrido no presente estudo que teve além destes interferentes uma casuística peculiar de indivíduos: • com resultados EIA discordantes em outras Unidades de Saúde, • que aguardavam teste confirmatório, • com manifestações clínicas e sorologia HTLV não reagente, • com problemas hematológicos como talassemia e hemofilia, • com HIV/AIDS, entre outros. Portanto, a casuística atendida pelo IAL requer atenção e procedimentos especiais confirmando a utilização de dois EIAs na triagem para minimizar resultados falsos negativos.

Vários estudos de soroprevalência de HTLV-1/2 no Brasil descrevem a utilização de coleta única de sangue, com repetição em duplicata do teste de triagem para as amostras reagentes, seguido de teste confirmatório de WB ou PCR (Sabino et al., 1999; Tamegão-Lopes et al., 2006; Moxoto et al., 2007; Pimenta et al., 2008).

No entanto, em 1994, Gallo et al. ao analisarem 50 soros de UDI de São Francisco, EUA que resultaram não reagentes ou fracamente reagentes em um EIA testado, confirmaram positividade para a infecção por HTLV-2

por IFI e PCR. Esses soros apresentaram reatividade variada à análise por WB.

Thorstensson et al. (2002), em estudo conduzido em Laboratório de Referência na Suécia mostraram que a aplicação de algoritmo de dois EIAs concomitantes na triagem sorológica resultava em 100% de sensibilidade para detectar anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2. Mostraram que o teste confirmatório INNO-LIA apresentava 94% de sensibilidade para o diagnóstico de HTLV-2 e propuseram como primeiro teste confirmatório o INNO-LIA, seguido do WB nos soros indeterminados. Nos casos em que o WB resultasse indeterminado, sugeriram acompanhamento do paciente e a utilização da PCR.

Berini et al. (2007a; 2007b; 2008; 2010) também preconizaram o uso de dois testes na triagem sorológica de HTLV-1/2 na Argentina, tanto em bancos de sangue como em população de risco. Relataram que poderia ser feita por dois EIAs ou por um EIA e um teste PA (Berini et al., 2008). Argumentaram que em regiões onde o HTLV-1 e o HTLV-2 são endêmicos, esta estratégia poderia melhorar o diagnóstico. O mesmo foi sugerido por Caterino-de-Araujo (2009a) para o Brasil e América Latina.

Em bancos de sangue que atendem população de baixo risco, a utilização de um EIA de 3ª geração na triagem sorológica parece ser suficiente. Neles não há obrigatoriedade de realização do teste confirmatório, porém muitos realizam o WB ou a PCR e encaminham os pacientes para Ambulatórios de Especialidades. A triagem seqüencial com dois EIAs foi sugerida por Gudo et al. (2008) em Moçambique.

Uma estratégia usada para diminuir custos e avaliar grande número de casos é o uso de *pool* de soros na triagem. Isto foi empregado em estudo multicêntrico da Europa, realizado pelo HTLV European Research Network, com 234.078 gestantes. Foram utilizados *pool* de dez soros e a triagem foi conduzida com dois ensaios seqüenciais. Quando reagentes, os soros do *pool* foram analisados separadamente. Soros duplamente reagentes foram submetidos ao teste confirmatório de WB (Taylor et al., 2005).

Sabino e Carvalho (2006) apresentaram três algoritmos de diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 para ser usado no Brasil. Em dois algoritmos a triagem seria feita com um EIA e no outro algoritmo por dois EIAs seqüenciais. Esses pesquisadores descreveram as vantagens e desvantagens de cada um dos algoritmos e ressaltaram a falta de uma PCR comercial ou padrão, para ser usada como teste confirmatório. Diferentemente do preconizado pelo MS (Brasil, 2003), a IFI não foi mencionada por estes autores como teste confirmatório. No entanto, a IFI foi utilizada em estudos de populações de risco nos EUA (Gallo et al., 1994), Brasil (Casseb et al., 1997a; 1997b) e na Argentina (Gastaldello et al., 1999), e embora tenha se mostrado sensível para detectar infecção por HTLV-1 e principalmente por HTLV-2, ela ainda apresenta problemas operacionais que dificultam sua utilização na rotina diagnóstica, como: manutenção de linhagens infectadas, necessidade de equipamentos especiais como microscópio de fluorescência, cabines e salas com níveis de segurança 2 e 3, técnicos altamente treinados, entre outros.

No Brasil, em vista do alto custo do teste de WB e do elevado número de soros com padrão inconclusivo (HTLV não tipado ou indeterminado), nos últimos anos foram propostas e utilizadas as PCRs (*tax* ou *pol*) como teste confirmatório e discriminatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2. No entanto, essas PCRs carecem de padronização quanto ao trecho do segmento proviral pesquisado, par de *primers* e sondas empregadas, além de não existirem estudos multicêntricos. Estas variáveis dificultam a comparação dos resultados obtidos (De-Araujo et al., 1994; Casseb et al., 1997a; Segurado et al., 2002; Laurentino et al., 2005; Vallinoto et al., 2006; Morimoto et al., 2007; Novoa et al., 2007; Costa e Segurado, 2009).

Mais recentemente, no Brasil, a PCR em tempo real qualitativa e quantitativa foi implantada e vem sendo usada para o diagnóstico e monitoramento da carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 em portadores assintomáticos, pacientes com TSP/HAM e outros. Da mesma forma que a PCR convencional, também carece de padronização e de estudos

multicêntricos (Montanheiro et al., 2005; Tamegão Lopes et al., 2006; Arruda et al., 2008; Andrade et al., 2010).

No presente estudo foram otimizadas as reações de PCR convencional e em tempo real para a amplificação dos segmentos do genoma proviral (*tax* e *pol*) de HTLV-1 e HTLV-2, e determinados os limites de detecção das técnicas utilizando-se amostras de DNA de duas linhagens celulares: C91/PL, infectada por HTLV-1, a qual apresenta 2,1 cópias provirais por célula (Popovic et al., 1983), BBF, infectada por HTLV-2 cujo número de cópias provirais não foi determinado (Calabrò et al. apud Gasperini et al., 2005). Assim, diferentemente do descrito em literatura, o limite de detecção destas PCRs tomou como base a maior diluição de DNA que resultou em PCR positiva, não o número de cópias provirais por célula.

Os resultados obtidos mostraram limite de detecção das PCRs (*pol* e *tax*) para HTLV-1 semelhante, portanto, qualquer uma dessas PCRs pode ser usada na identificação de HTLV-1 com a mesma sensibilidade. Já para o HTLV-2, as PCRs (*pol*) foram mais sensíveis, com destaque para PCR em tempo real. Porém, as curvas de emissão de fluorescência durante a amplificação da PCR em tempo real da linhagem BBF não apresentaram padrão sigmóide. Este DNA quando testado para o gene da albumina humana, mostrou positividade baixa, inferior a todas as amostras clínicas e à linhagem C91/PL. Ainda, quando analisados DNAs obtidos de células de pacientes confirmadamente infectados por HTLV-2 (por WB e PCR), as curvas de emissão de fluorescência mostraram padrão sigmóide, e confirmaram que não havia problemas com os *primers*, sonda ou outros componentes da PCR e sim, com o DNA da linhagem BBF. Assim, especulase que produtos ou componentes presentes nas culturas desta linhagem celular tenham sido as causas destes resultados. Com isto, passou-se a utilizar como controle positivo para HTLV-2 na PCR em tempo real, DNA de amostra clínica bem caracterizada.

Merece destaque a utilização de bases degeneradas na composição de alguns *primers* (**Quadro 3**) que não funcionaram bem quando sintetizados com seqüências descritas em literatura (dados não mostrados).

Após a otimização das PCRs, estas foram utilizadas como teste confirmatório em 73 amostras clínicas encaminhadas ao IAL para análise. Diversamente do esperado, o ensaio de WB foi mais sensível em relação aos moleculares. No entanto, as PCRs foram mais específicas e capazes de elucidar casos cujos soros resultaram HTLV não tipado ou indeterminado pela análise de WB. Vários fatores anteriormente mencionados podem ter interferido nos resultados obtidos, como: tipo de casuística encaminhada ao IAL (na maioria composta por amostras “problemas”), como descrito por Gallo et al. (1994); quantidade e qualidade do material biológico, etc.

Para diminuir custos e tempo, as células mononucleares (CMNs) do sangue periférico que contém os provírus HTLV-1 e HTLV-2, não foram separadas no presente estudo, tampouco quantificadas. Isto pode ter sido responsável, em parte, pelos resultados negativos nas PCRs, pois apesar do DNA ser de boa qualidade (albumina positivo), nem todo DNA era proveniente de CMNs. Há que se ressaltar que a estratégia adotada pelo IAL consiste em separar plasma de PBL e armazenar estes PBLs em freezer a - 20°C. Quando o plasma resulta reagente na triagem é extraído o DNA dos PBLs correspondentes. Isto é feito porque apenas 9% das amostras encaminhadas atualmente ao IAL resultam HTLVs positivas na triagem, e seria um desperdício de tempo e dinheiro realizar o leucograma e a separação das CMNs de toda a casuística enviada (mais de 90% das CMNs seriam descartadas).

Tamegão-Lopes et al. (2006) também usaram PBL para a extração de DNA, porém realizaram a contagem de leucócitos para quantificar carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 na PCR em tempo real.

As PCRs *pol* foram mais sensíveis que a *tax* para detectar segmentos do genoma de HTLV-2 em amostras clínicas à semelhança do que ocorreu com as linhagens celulares. Houve quatro casos HTLV PCR positivas pela *pol* e três casos HTLV PCR positivas pela *tax* em amostras de sangue que resultaram WB indeterminadas. Soldan et al. (1999) e Costa (2004), relataram resultados diferentes quando compararam a sensibilidade das PCRs *tax* e *pol*, apontando para melhores resultados quando usada a

PCR *tax*. No entanto, esses autores usaram na primeira PCR (*pol*) os primers SK110 e SK111 sem as bases degeneradas. Talvez este tenha sido o motivo dos resultados discordantes entre estes estudos e o estudo atual.

De maneira geral e usando o WB como padrão ouro, as PCRs para HTLV-1 foram mais sensíveis (83,33%) do que as PCRs para HTLV-2 (71,43%). Isto pode ser explicado pela menor carga proviral identificada nas infecções por HTLV-2, o que pode de certa forma estar relacionado com menor potencial oncogênico deste vírus em relação ao HTLV-1 (Lee et al., 2004; Proietti, 2006; Montanheiro et al., 2008). Outra explicação poderia ser o pequeno número de CMNs presentes em indivíduos infectados por HIV, principalmente na fase de doença AIDS. De fato, 5/11 (45%) amostras que resultaram negativas na PCR, eram de pacientes HIV/AIDS provenientes de CRTA ou outras Unidades de Saúde onde estavam em acompanhamento para quantificação de células CD4/CD8 e carga viral de HIV (dados não mostrados). O real status imunológico destes indivíduos é desconhecido, mas pode-se especular que muitos eram imunossuprimidos e que o pequeno número de células T (infectadas pelos HTLV-1 e HTLV-2) pode ter contribuído para os resultados negativos das PCRs (Visconti et al., 1993; Zehender et al., 1997; Roucoux e Murphy, 2004; Bassani et al., 2006).

Corroborando com esta hipótese, Machuca e Soriano (2000) descreveram flutuações nos valores de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 em um paciente infectado por HTLV-1 com HAM e dois com co-infecção HIV/HTLV-2 que receberam terapia com azidovudina e lamivudina. Houve diminuição da carga proviral de HTLV-1 no paciente com HAM logo no início do tratamento, e esta se manteve baixa durante todo o estudo. Para os pacientes com HTLV-2, houve um aumento da carga proviral de HTLV-2 logo no início do tratamento (provavelmente devido à redução da carga viral do HIV e consequentemente aumento de células T, incluindo as infectadas por HTLV-2), e posteriormente redução da carga proviral de HTLV-2 durante o estudo. Portanto, dependendo da fase da pesquisa de carga proviral, os resultados podem variar em um mesmo indivíduo. Martins e Stancioli (2006) também comentaram sobre a flutuação nos valores de carga proviral de

HTLV e ressaltaram que ainda resta muito, a saber, sobre a dinâmica da relação hospedeiro-parasita nesta infecção viral.

Em oposição à casuística atual, baixos percentuais (em torno de 0,5%) de resultado falso negativo na PCR em tempo real foram detectados em população de banco de sangue e em população sob aconselhamento clínico de infecção por HTLV (Arruda et al., 2008; Andrade et al., 2010). Pode-se especular que nestas populações a quantidade e qualidade da amostra de sangue são controladas e que esses indivíduos têm boa condição imunológica.

Em relação ao WB, os resultados indeterminados podem ter ocorrido devido a período de soroconversão em que se encontravam os pacientes e/ou a possíveis reações cruzadas em casos de co-infecção com outros vírus e/ou parasitas (Medrano et al., 1997; Maucière et al., 1997; Jacob et al., 2008a). Ainda, podem representar falta de reatividade de anticorpos dirigidos a componentes antigênicos presentes nas tiras de WB, que seriam diferentes daqueles presentes em isolados brasileiros de HTLV-1, e principalmente, de HTLV-2. Recentemente, Olah et al. (2010) analisando segmento do envelope viral de HTLV-2 [região usada na confecção de tiras do WB 2.4 (K55, rgp46-II)] e comparando-o com segmentos de HTLV-2 de isolados de pacientes de São Paulo, não foram capazes de encontrar associação entre alteração de nucleotídeos neste segmento do genoma proviral e resultado indeterminado no WB, status imunológico do paciente e tampouco carga proviral de HTLV-2. No entanto, outros estudos se fazem necessários para ampliar e confirmar esses resultados, uma vez que alterações em outras regiões do genoma proviral podem indiretamente afetar a produção de anticorpos.

Um fato curioso diz respeito a uma possível associação entre perfil de bandas detectado no WB e o resultado da PCR. Vários estudos sugeriram que perfil indeterminado com bandas de *gag* (com destaque para a p19) estava mais relacionado à infecção por HTLV-1, enquanto a presença de bandas p24, GD21, e/ou rgp46-II com HTLV-2 (Morimoto et al., 2007; Berini et al., 2007b; Jacob et al., 2008b; Olah et al., 2010). De fato, isto foi

observado no presente estudo com as amostras que resultaram PCR positivas e cujo padrão no WB era inconclusivo.

Alguns inquéritos epidemiológicos de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, mostraram maior percentual de resultados indeterminados à análise pelo WB em relação aos resultados positivos. Em 1997, Segurado et al. analisando casuística de banco de sangue de São Paulo detectaram pelo WB 0,14% de resultados indeterminados e 0,03% de resultados positivos, enquanto Césaire et al. (1999) na Martinica encontraram 0,50% de soros com padrão indeterminado e 0,40% positivos para HTLV-1 em banco de sangue. Digno de nota, laudos com resultados indeterminados acarretam insegurança e dúvidas para o paciente e seus familiares e problemas de aconselhamento para o clínico e para o pessoal de apoio.

Embora não tenha sido aplicada no trabalho atual, a PCR em tempo real quantitativa permite a detecção da carga proviral presente em pacientes infectados por HTLV-1/2, sendo considerada relevante no monitoramento do paciente, com valor diagnóstico e prognóstico (Proietti, 2006).

Em 2008, Loureiro em estudo com portadores assintomáticos, evidenciou que 55% deles apresentavam carga proviral de HTLV-1 média de 53.600 cópias/ 10^6 CMNs. Ao comparar esses valores com os obtidos em pacientes sintomáticos mostraram que os pacientes com ATL e os com TSP/HAM apresentaram respectivamente, 1,2 e 2,1 vezes maior carga proviral que os portadores assintomáticos. Corroborando estes resultados, outros estudos descreveram que a carga proviral média em pacientes com TSP/HAM é de 2,5 a 17 vezes acima do valor da carga proviral detectada em portadores assintomáticos (Kubota et al., 1993; Nagai et al., 1998; Hashimoto et al., 1998; Montanheiro et al., 2005). Portanto, estas pesquisas mostram a importância da determinação da carga proviral no acompanhamento clínico dos infectados.

Analisando agora a casuística deste estudo sob o ponto de vista epidemiológico (embora com viés), foi possível observar que mais mulheres resultaram HTLV-1 positivas, e mais homens HTLV-2 positivos, com maior prevalência na faixa etária dos 40 aos 49 anos. Embora sem significância

estatística, estes resultados concordam com dados de literatura e podem estar relacionados às vias de aquisição/transmissão viral, já que as mulheres preferencialmente se infectam pela via sexual, enquanto os homens pela via sangüínea (associada ao UDI). De fato, a infecção por HTLV-2 há muito foi associada com a infecção por HCV, provavelmente pelo compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas por esses vírus (Murphy et al., 1996; Etzel et al., 2001; Segurado et al., 2004; Morimoto et al., 2005; Berini et al., 2007b). Para as mulheres, foi relatado que a melhor eficiência da transmissão do homem para a mulher aliada a hormônios femininos seriam fatores determinantes de infecção por HTLV-1 neste gênero (Proietti et al., 2005). Ainda, mais mulheres são acometidas pela TSP/HAM (Proietti, 2006) e talvez por isso busquem diagnóstico nas Unidades de Saúde. Cabe aqui enfatizar a importância do diagnóstico diferencial, já que o HTLV-1 está relacionado com doenças graves, enquanto o HTLV-2 não.

Quanto à faixa etária, uma possível explicação para o aumento da prevalência de infecção por HTLV-1/2 com a idade poderia ser o acúmulo de novas infecções durante a vida (re-exposições) e/ou ao efeito de “*age-cohort*”. Neste, a soroprevalência para HTLV-1/2 teria diminuído nas últimas décadas devido à maior elucidação diagnóstica e ao controle feito em bancos de sangue e no pré-natal, o que teria diminuído e prevenido novas infecções por esses vírus (Proietti et al., 2005).

Considerando todos estes resultados e dados de literatura e, independentemente do desempenho dos testes confirmatórios apresentados neste estudo, fica evidente que nenhum ensaio, sorológico ou molecular sozinho, é capaz de detectar todos os casos de infecção por HTLV-1/2 em população de risco.

A análise custo/benefício realizada neste estudo mostrou que o uso da PCR em tempo real precedendo o emprego do WB como teste confirmatório reduz em aproximadamente 44% os custos financeiros, além de diminuir em 7% os resultados indeterminados no WB. Enfatize-se que em relação à PCR convencional, a PCR em tempo real não requer manipulação do produto amplificado, não produz resíduo tóxico ou deletério,

não contamina as amostras biológicas e o ambiente de trabalho e pode ser otimizada no formato *multiplex*. No ensaio *multiplex*, são usados conjuntos de *primers* e sondas marcadas com diferentes fluoróforos que permitem a identificação simultânea de diferentes tipos e subtipos virais. De fato, alguns trabalhos já descrevem a PCR em tempo real no formato *multiplex* com ótimos resultados para ser utilizada em regiões endêmicas de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 (Estes e Sevall, 2003), HTLV-1, HTLV-2, HIV-1 e HIV-2 (Vet et al., 1999) e HTLV-1/STLV-1, HTLV-2, HTLV-3/STLV-3 (Besson e Kazanji, 2009). Outra possibilidade da PCR em tempo real é a utilização de *SYBR green* em substituição às sondas fluorescentes o que reduz ainda mais seu custo (Lee et al., 2004; Vitone et al., 2006; Arruda et al., 2008).

Concluindo, laboratórios que já dispõem de equipamento para PCR em tempo real devem considerar a possibilidade de implantar este ensaio no diagnóstico de infecção por HTLV-1/2. Naqueles onde não existe o equipamento, mas que recebem um grande número de amostras para serem analisadas ou que pertençam a regiões endêmicas de infecção por HTLV-1/2, a aquisição do equipamento e a compra dos reagentes poderão em curto prazo diminuir os gastos com este diagnóstico. No entanto, deve-se levar em consideração que a pesquisa de anticorpos específicos feita pelo WB não pode ser abandonada, e deverá ser executada nos casos que a PCR em tempo real resultar negativa.

O Algoritmo IAL 2010 sugerido neste trabalho deve ser validado com um número maior de amostras de sangue, para depois ser implantado na rotina diagnóstica do IAL e sugerido para os demais Laboratórios de Diagnóstico no Brasil.

6. CONCLUSÕES

- Ajustes no valor do *cut-off* dos kits EIAs de 3ª geração podem aumentar a especificidade destes ensaios no diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.
- Algoritmos simples, de coleta única de sangue em tubo contendo anticoagulante são os mais apropriados para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.
- A PCR em tempo real se apresentou como um teste rápido, seguro, de baixo custo e de fácil execução podendo ser utilizado como o primeiro teste confirmatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.
- O ensaio confirmatório de WB necessita ser empregado como complementar à PCR em tempo real.

7. REFERÊNCIAS

Andersson S, Thorstensson R, Ramirez KG, Krook A, Sydow MV, Dias F et al. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion*. 1999; 39(8): 845-1.

Arruda BC, Lira RA, Loureiro P, Brandão L, Souza P, Souza WV et al. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in patients in the Hematologia da Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30(5): 384-9.

Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MSS, Silva SMN, Basques FV, Ribas JG et al. Análise do uso da PCR em tempo real para HTLV-1 e 2 como teste confirmatório na triagem de doadores de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*. 2010; 43(2): 111-5.

Bagheri F, Patel K, Samourjian E, Pathak N, Shamalov V, Gintautas J et al. Further evidence that HTLV protects against HIV progression. *Infect Med*. 2008; 1: 5.

Bassani S, Toro C, Jiménez V, Rodés B, Soriano V. Can the level of immunosuppression in human immunodeficiency virus-infected patients affect the reliability of human T-cell lymphotropic virus type 2 serological diagnosis? *Clin Vac Immunol*. 2006; 160-1.

Beck A, Lima MC, Castro MC, Drummond DX, Oliveira ML, Oelemann W et al. Performance of HTLV-1 screening assays in Brazil. *Zentralbl Bakteriol*. 1996; 283: 340-6.

Beck ST, Silva JCN, Schimit S, Fleck J, Santos RS. Taxa de probabilidade como guia de interpretação do FAN-HEp-2 na pesquisa de autoanticorpos no lúpus eritematoso sistêmico. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45(4): 275-83.

- Beilke MA, Theall KP, O'Brien M, Clayton JL, Benjamin SM, Winsor EL et al. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfectd with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(2): 256-63.
- Berini CA, Pando MA, Bautista CT, Eirin ME, Martinez-Peralta L, Weissenbacher M et al. HTLV-1/2 Among high-risk groups in Argentina: molecular diagnosis and prevalence of different sexual transmitted infections. *J Med Virol*. 2007a; 79: 1914-20.
- Berini CA, Eirin ME, Pando MA, Biglione MM. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *J Med Virol*. 2007b; 79: 69-73.
- Berini CA, Pascuccio MS, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodriguez C et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods*. 2008; 147: 322-7.
- Berini CA, Gendler AS, Pascuccio S, Eirin ME, McFarland W, Page K et al. Decreasing trends in HTLV-1/2 but stable HV-1 infection among replacement donors in Argentina. *J Med Virol*. 2010; 82: 873-7.
- Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation and quantification of human T-cell leukaemia viruses types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol*. 2009; 1129-35.
- Bio-mirror Web site. Retrovírus. [acesso em 18 ago. 2010]. Disponível em: <http://ictvdb.bio-mirror.cn/Images/final2.jpg>
- Biswas HH, Kaidarova ZMA, Garratty G, Gible JW, Newman BH, Smith JW et al. Increased all-cause and cancer mortality in HTLV-II infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 54(3): 290-6.

Bittencourt AL. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1998; 40: 245-51.

Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB, Santos M, Valadão E, Alcantara LC et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in Northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 26: 490-4.

Bittencourt AL, Primo J, Oliveira MFP. Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. *J Pediatr*. 2006; 82(6): 411-20.

Black FL, Biggar RJ, Lal RB, Gabbai AA, Vieira Filho JPB. Twenty-five years of HTLV type II follow-up with a possible case of tropical spastic paraparesis in the Kayapo, a Brazilian Indian Tribe. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1996; 12: 1623-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 de dez. 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e da outras providências].

Brasil. Ministério da Saúde. HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. 1998. II (Série TELELAB); 54p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria em Vigilância da Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Guia de manejo clínico de HTLV. Brasília, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 34, de jul. 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 de jul. 2005. Procedimentos seqüenciados para realização do diagnóstico da infecção pelo HIV utilizando-se testes rápidos em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses. [Regulamenta o uso de testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais].

- Brites C, Alencar R, Gusmão R, Pedroso C, Pedral-Sampaio D, Badaró R et al. Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS*. 2001; 15: 2053-5.
- Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV/Human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS*. 2009; 11: 8-16.
- Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 2005; 2: 1-4.
- Calabrò ML, Luparello M, Grottola A, Del Mistro A, Fiori JR, Angarano G, Chieco-Bianchi L. Detection of human T lymphotropic virus type II/b in human immunodeficiency type 1-coinfected persons in southeastern Italy. *J Infect Dis*. 1993; 168: 1273-7.
- Carminati R, Bahia R, Costa LFM, Paule BJA, Vale VL, Regis L et al. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. *Rev Ciên Méd Biol*. 2003; 2(1): 88-93.
- Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Martins-Filho OA et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*. 2002; 35(5): 499-508.
- Carvalho MMN, Novaes AE, Marcelino De Carvalho E, Araújo MI. Doenças reumáticas auto-imunes em indivíduos infectados pelo HTLV-1. *Rev Bras Reumatol*. 2006; 46(5): 334-9.
- Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. *AIDS Rev*. 2007; 9: 140-9.
- Casseb J, Caterino-de-Araujo A, Hong MA, Salomão S, Gallo D, Hendry RM et al. Prevalence of HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1-infected

asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1997a; 39(4): 213-5.

Casseb J, Souza T, Pierre-Lima MT, Yeh E, Hendry MR, Gallo D. Testing problems in diagnosing HTLV infection among intravenous drug users with AIDS in São Paulo city, Brazil. AIDS Res Hum Retrovir. 1997b; 13: 1639-41.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA, Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. Cad Saúde Púb (RJ). 2005; 21: 926-31.

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabro ML, Favero A et al. Sensitivity of two ELISA tests in relation to *Western blot* in detecting HTLV-I and HTLV-II infection among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 1998; 30: 173-82.

Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. J Virol Methods. 2009a; 156: 150-1.

Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro. Rev Inst Adolfo Lutz. 2009b; 68(2): 182-6.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Current trends licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. Morb Mortal Wkly Rep. 1988; 37(48): 736-40. [acesso em 11 set. 2001]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001311.htm>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Current trends human T lymphotropic virus type I screening in volunteer blood donors – United States, 1989. Morb Mortal Wkly Rep. 1990; 39(50): 915, 921-4. [acesso em 15 jul. 2001]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001864.htm>

Césaire R, Bera O, Maier H, Lezin A, Martial J, Ouka M et al. Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. *Transfusion*. 1999; 39: 1145-9.

Costa EAS, Jacob F, Feliciano R, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(2): 314-7.

Costa JMP. Padronização e emprego de métodos de amplificação molecular para pesquisa de seqüências genômicas dos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I e II (HTLV-I/II) em indivíduos com sorologia indeterminada [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2004. 116pp.

Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 44: 185-9.

Covas DT, Kashima S. Complete Nucleotide Sequences of the Genomes of Two Brazilian Specimens of Human T Lymphotropic Virus Type 2 (HTLV-2). *AIDS Res Hum Retrovir*. 2003; 19(8): 689-97.

Dal Fabbro MMFJ, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas GMB et al. Infecção pelo HTLV 1/2: atuação no pré-natal como estratégia de controle da doença no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*. 2008; 41(2): 148-51.

Dall'Agnol UAG. Coleção de soros para avaliação de *kits* de triagem sorológica (ensaios imunoenzimáticos – EIAs) de detecção de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 [monografia]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz, 2010. 65pp.

- De-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier De Souza ML, Mammano F, Del Mistro A et al. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol.* 1994; 10: 165-71.
- Defer C, Coste J, Descamps F, Voisin S, Lemaire JM, Maniez M et al. Contribution of polymerase chain reaction and radioimmunoprecipitation assay in the confirmation of human T-lymphotropic virus infection in French blood donors. Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion. *Transfusion.* 1995, 35(7): 596-600.
- De Oliveira MF, Brites C, Ferraz N, Magalhães P, Almeida F, Bittencourt AL. Infective dermatitis associated with the human T-cell lymphotropic virus type I HTLV-I in Salvador, Bahia, Brazil. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 90-6.
- Dooneief G, Marlink R, Bell K, Marder K, Renjifo B, Stern Y et al. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology.* 1996; 46: 1556-60.
- Dourado I, Andrade T, Carpenter CL, Galvão-Castro B. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in Northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94: 13-8.
- Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003; 34: 527-31.
- Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med.* 2000; 18: 109-19.
- Eiraku V, Monken C, Kubo T, Zhu SW, Rios M, Bianco C et al. Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphism analysis of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type II. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1995; 11: 625-36.

- Estes MC, Sevall JS. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV I or II. *Mol Cell Probes*. 2003; 17: 59-68.
- Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge ML, Damas CD, Segurado AA. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 26: 185-90.
- Ferreira OC Jr, Vaz RS, Carvalho MB, Guerra C, Fabron AL, Rosemblyt J et al. Human T lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. *Transfusion*. 1995; 35: 258-63.
- Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Souza Júnior VG, Botelho CA, Duarte G. Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005; 27(12): 719-25.
- Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 1995; 86: 3619-39.
- Fujiyama C, Fujiyoshi T, Matsumoto D, Tamashiro H, Sonoda S. Evaluation of commercial HTLV-1 test kits by a standard HTLV-1 serum panel. *Bull World Health Organ*. 1995; 73(4): 515-21.
- Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sem L, Medeot S. Usefulness of a nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(4): 377-80.
- Gallo D, Diggs JL, Hanson CV. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus *Western blot* (immunoblot) kits with problems specimens. *J Clin Microbiol*. 1994; 32: 2046-9.

- Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997; 37(2): 242-3.
- Gasperini P, Barbierato M, Martinelli C, Rigotti P, Marchini F, Masserizzi G et al. Use of a BJAB-derived cell line for isolation of human herpesvirus 8. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(6): 2866-75.
- Gastaldello R, Gallego S, Isa MB, Nates S, Medeiros S. Efficiency of indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for the diagnosis of human retrovirus infection (HIV-I and HTLV-I/II) in different at risk populations. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1999; 41(3): 159-64.
- Gessain A, Mahieux R, de Thé G. HTLV-I "Indeterminate" *Western blot* patterns observed in sera from tropical regions: the situation revisited. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995; 9(3): 316-9.
- Gessain A, de Thé G. What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996; 13(1): S228-35.
- Gotuzzo E, Arango C, Araujo AQC, Isturiz RE. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North America*. 2000; 14: 211-39.
- Governo do Estado de Minas Gerais. Lei nº 17.344, de jan. 2008. Teste sorológico para HTLV é obrigatório na rede pública. [Abrange o diagnóstico, tratamento e prevenção dos vírus HTLV-1 e 2].
- Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene*. 2005; 24: 5976-85.
- Gudo ES, Abreu CM, Mussá T, Augusto AR, Otsuki K, Chambo E et al. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo city, Mozambique. *Transfusion*. 2009; 49(6): 1146-50.

Hall WW, Kubo T, Lijichi S, Takahashi H, Zhu SW. Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Sem Virol*. 1994; 5: 165-78.

Hall WW, Ishak R, Zhu SW, Novoa P, Eiraku N, Takahashi H et al. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties and clinical features of infection. *J Acq Imm Def Synd Hum Retrovirol*. 1996; 13: S204-14.

Hartley MT, Malone GE, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Evaluation of a recombinant human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p21E antibodies detection enzyme immunoassay as a supplementary test in HTLV-I/II antibody testing algorithms. *J Clin Microbiol*. 1991; 29: 1125-27.

Hashimoto K, Higuchi I, Osame M, Izumo S. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. *J Neurol Sci*. 1998; 159(1): 67-72.

Hayes CG, Burans JP, Oberst RB. Antibodies to human T lymphotropic virus type I in a population from the Philippines: evidence for cross-reactivity with *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 1991; 163: 257-62.

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 1605-7.

Ishak R, Harrington Jr WJ, Azevedo VN, Eiraku N, Ishak MOG, Guerreiro JF et al. Identification of T cell lymphotropic virus type IIa in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1995; 11: 813-21.

Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Ishak MOG. The epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infections among indian populations of the Amazon region of Brazil. *Cad Saúde Pú (RJ)*. 2003; 19: 109-18.

Jacob F. Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise. [dissertação]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2007. 103pp.

Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007; 49(6): 361-4.

Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008a; 42: 149-55.

Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. *BEPA*. 2008b; 5: 12-8.

Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-Fortuna E, Caterino-de Araujo A. Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in “at-risk” individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2009; 159: 288-90.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982; 218: 571-3.

Karopoulos A, Silvester C, Dax EM. A comparison of the performance of nine commercially available anti-HTLV-I screening assays. *J Virol Methods*. 1993; 45: 83-91.

- Kim JM, Song YG, Oho YC, Park HC, Kwon KH, Kim E et al. Antibodies to human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) by particle agglutination (PA) test in Korean blood donors. *Yonsei Med J.* 1999; 40(2): 173-7.
- Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *J Amer Med Assoc.* 1986; 256 (17): 2342.
- Kitajima I, Yamamoto K, Sato K, Nakajima Y, Nakajima T, Maruyama I et al. Detection of human T cell lymphotropic virus type I proviral DNA and its gene expression in synovial cells in chronic inflammatory arthropathy. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1315-22.
- Kline RL, Vlahov D, Quinn TC. Improved detection of HTLV-II antibody using a whole viral lysate-based EIA. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994; 7(12): 1291-2.
- Kobayashi S, Yoshida T, Hiroshige Y, Matsui T, Yamamoto N. Comparative studies of commercially available particle agglutination assay and enzyme-linked immunosorbent assay for screening of human T-cell leukemia virus type I antibodies in blood donors. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(2): 308-12.
- Komurian-Pradel F, Pelloquin F, Sonoda S, Osame M, De The G. Geographical subtypes demonstrated by RFLP following PCR in the LTR region of HTLV-I. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1992; 8(4): 29-34.
- Krook A, Blomberg J. HTLV-II among injecting drug users in Stockholm. *Scand J Infect Dis.* 1994; 26: 129-32.
- Kubota R, Fujiyoshi T, Izumo S, Yashiki S, Maruyama I, Osame M et al. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol.* 1993; 42: 147-54.
- Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus

coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 371-6.

Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J Clin Virol*. 2004; 31: 275-82.

Lewis MJ, Novoa P, Ishak R, Ishak M, Salemi M, Vandamme AM et al. Isolation, cloning, and complete sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology*. 2000; 271: 142-54.

Lewis MJ, Sheehy N, Salemi M, VanDamme AM, Hall WW. Comparison of CREB- and NF-kappaB-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) tax proteins. *Virology*. 2002; 295(1): 182-9.

Lipka JJ, Miyoshi I, Hadlock KG, Reyes GR, Chow TP, Blattner WA et al. Segregation of human T cell lymphotropic virus type I and II infections by antibody reactivity to unique viral epitopes. *J Infect Dis*. 1992; 165: 268-72.

Lopes MASN, Carneiro-Proietti ABF. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008; 30(3): 229-40.

Loureiro P. Infecção pelo HTLV-1: diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste. [tese]. Recife (PE): Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, 2008. 172pp.

Machuca A, Soriano V. In vivo fluctuation of HTLV-I and HTLV-II proviral load in patients receiving antiretroviral drugs. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000; 24(2): 189-93.

- Magri MC, Morimoto HK, Brígido LFM, Rodrigues R, Caterino-de-Araujo, A. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV-2 molecular variants identified in Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2010 (in press).
- Mahieux R, Horal P, Maucière P, Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Meertens L et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 Gag indeterminate *Western blot* patterns in Central Africa: Relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(11): 4049-57.
- Mahieux R, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. *Path Biol*. 2009; 57: 161-6.
- Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sem L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate *Western blot* patterns. *J Med Virol*. 2004; 74: 323-7.
- Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadern Saúde Colet (RJ)*. 2003; 11(1): 7-31.
- Martins ML, Stancioli EFB. Patogênese da infecção pelo HTLV. In: PROIETTI ABFC ed. HTLV - Cadernos Hemominas. 2006; 8: 61-8.
- Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*. 2009; 6: 71.
- Maucière P, Hesran JYL, Mahieux R, Salla R, Mfoupouendoun J, Abada ET et al. Demographic, ethnic, and geographic differences between human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I-seropositive carriers and persons with HTLV-I Gag-indeterminate Western blots in Central Africa. *J Infect Dis*. 1997; 176: 505-9.
- Medrano FJ, Soriano V, Calderón EJ, Rey C, Gutiérrez M, Bravo R et al. Significance of indeterminate reactivity to human T-cell lymphotropic virus in *Western blot* analysis of individuals at risk. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1997; 16: 249-52.

Menna-Barreto M, Bender AL, Bonatto SL, Freitas LB, Salzano FM, Tsuneto LT et al. Human T-cell lymphotropic virus type II in Guaraní Indians, Southern Brazil. *Cad Saúde Púb (RJ)*. 2005; 21(6): 1947-51.

Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Amer J Ophtalmol*. 1992; 114: 123-9.

Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 28: 1643-7.

Montanheiro PA, Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Penalva de Oliveira AC, Kanzaki LIB et al. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res*. 2008; 135: 22-5.

Morimoto HK. Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I (HTLV-I) e II (HTLV-II) em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em Londrina e região, Paraná. [dissertação]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2003. 171pp.

Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, Reiche EM, Ueda LT, Matsuo T. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2005; 21: 256-62.

Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reice FV et al. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007; 49(4): 225-30.

- Moxoto I, Boa-Sorte N, Nunes C, Mota A, Dumas A, Dourado I et al. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*. 2007; 40(1): 37-41.
- Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control*. 1991; 2: 37-52.
- Murphy EL. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996; 13(1): 215-9.
- Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Med Virol*. 1998; 4(6): 586-93.
- Novoa P, Penalva de Oliveira AC, Posada Vergara MP, Duarte AJS, Casseb J. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. *J Med Virol*. 2007; 79: 182-7.
- Olbrich Neto J, Meira DA. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu, São Paulo - Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*; 2004; 37: 28-32.
- Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Penalva de Oliveira AC, Duarte AJS, Casseb J. Neither molecular diversity of envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. *J Med Virol*. 2010; 82: 837-42.
- Olaleye DO, Ekweozor CC, Sheng Z, Rasheed S. Evidence of serological cross-reactivities with human immunodeficiency virus types 1 and 2 and

human T-lymphotropic virus types I and II in sera of pregnant women in Ibadan, Nigeria. *Intern J Epidemiol*. 1995; 24(1): 198-203.

Orland JR, Engstrom J, Fridey J, Sacher RA, Smith JW, Nass C et al. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV outcomes study. *Neurology*. 2003; 61: 1588-94.

Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T lymphotropic virus type I and adult T cell leukemia like cells. *Ann Neurol*. 1987; 21: 117-22.

Pimenta FCF, Haddad SK, Medeiros Filho JG, Costa MJC, Diniz MFM, Fernandes MP et al. Prevalence ratio of HTLV-1 in nursing mothers from the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *J Hum Lact*. 2008; 24(3): 289-92.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 7415-9.

Poiesz BJ, Dube S, Choi D, Esteban E, Ferrer J, Leon-Ponte M et al. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. *Transfusion*. 2000; 40: 924-30.

Popovic M, Sarin PS, Robert-Gurroff M, Kalyanaraman VS, Mann D, Minowada J, Gallo RC. Isolation and transmission of human retrovirus (human T-cell leukemia virus). *Science*. 1983; 219: 856-9.

Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LMI, Bonasser F, Duarte AJS, Penalva De Oliveira AC et al. Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) simile diagnosis in HIV-1-co-infected subjects. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006; 48: 207-10.

- Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005; 24: 6058-68.
- Proietti AB de FC. HTLV Cadernos Hemominas. Minas Gerais: Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 2006.
- Quispe NCS, Feria EB, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Confirming the presence of HTLV-1 infection and the absence HTLV-2 in blood donors from Arequipa, Peru. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009; 51(1): 25-9.
- Ratner L, Philpott T, Trowbridge DB. Nucleotide sequence analysis of isolates of human T-lymphotropic virus type I of diverse geographical origins. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1991; 7(11): 923-41.
- Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*. 2004; 6: 144-54.
- Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Sáez-Alqueézar A. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(5): 1324-8.
- Sabino EC, Carvalho SMF. Diagnóstico laboratorial do HTLV. In: PROIETTI ABFC ed. HTLV - Cadernos Hemominas. 2006; 8: 61-8.
- Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Custódio AV, Araújo TP. Treinamento em PCR para o diagnóstico laboratorial de *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae* em líquido e sangue. [manual]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - Instituto Adolfo Lutz, 2006. 49pp.
- Sacchi CT. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. *BEPA*, 2007; 4(40): 24-7.

Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology*. 2009; 6: 19.

Salemi M, Doorena SV, Audenaerta E, Delaporteb E, Goubaua P, Desmytera J et al. Two new human T-lymphotropic virus type-I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLVI strains. *Virology*. 1998; 246(2): 277-87.

Santos TJJ, Costa CMC, Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J, Dooren SV et al. *Western blot* seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis*. 2003; 7(3): 202-9.

Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J Clin Exp Hematop*. 2010; 50(1): 1-8.

Schechter M, Harrison LH, Halsey NA, Trade G, Santino M, Moulton LH, Quinn TC. Coinfection with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV in Brazil. *JAMA*. 1994; 271(5): 353-7.

Segurado AAC, Malaque CMS, Sumita LM, Pannuti CS, Lal RB. Laboratory characterization of human T cell lymphotropic virus types 1 (HTLV-1) and 2 (HTLV-2) infections in blood donors from Sao Paulo, Brazil. *Am J Trop.Med Hyg*. 1997; 57(2): 142-8.

Segurado ACC, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge MLSG et al. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic

paraparesis from São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 329-33.

Segurado AC, Braga P, Etzel A, Cardoso MRA. Hepatitis C vírus coinfection in a cohort of HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and associated factors. AIDS Patient Care STDs. 2004; 18(3): 135-43.

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80(12): 3618-22.

Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen IS et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. Proc Natl Acad Sci USA. 1985; 82: 3101-5.

Slattery JP, Franchini G, Gessain A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. Genome Res. 1999; 9: 525-40.

Soares RMG, Moraes Junior HV. Manifestações oculares observadas em indivíduos infectados por HTLV-I no Rio de Janeiro. Arq Bras Oftal. 2000; 63(4): 293-8.

Soldan SS, Graf MD, Waziri A, Flerlage AN, Robinson SM, Kawanishi T et al. HTLV-I/II seroindeterminate *Western blot* reactivity in a cohort of patients with neurological disease. J Infect Dis. 1999; 180: 685-94.

Soriano V, Gutiérrez M, Tuset C, Martínez-Zapico R, Caldéron E, González-Lahoz. Avoiding false-negative results for HTLV-II using new serological assays. Am J Med. 1995; 98: 103.

Souza PRS. Uma análise em possíveis casos de patologias médicas utilizando a Curva ROC em lógica paraconsistente adotada para apoio a decisão médica em busca de melhor precisão de resposta na Web. [trabalho

de conclusão de curso]. São Paulo (SP): Universidade Santa Cecília, 2008. 10pp.

Switzer WM, Pieniazek D, Swanson P, Samdal HH, Soriano V, Khabbaz RF et al. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol*. 1995; 69: 621-32.

Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC, Lemos JAR. HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*. 2006; 39: 548-52.

Taylor GP, Bodéus M, Courtois F, Pauli G, del Mistro A, Machuca A et al. The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses types I and II in Europe: a prospective study of pregnant women. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 38(1): 104-9.

Thorstensson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusion*. 2002; 42: 780-91.

Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of "nested" PCR products. *J Virol Methods*. 1992; 40: 163-74.

Turci M, Pilotti E, Ronzi P, Magnani G, Boschini A, Parisi SG et al. Coinfection with HIV-1 and human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 2006; 41: 100-6.

Vallinoto ACR, Pontes GS, Muto NA, Lopes IG, Machado LF, Azevedo ZN et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated afro-brazilian quilombo located in the Marajó island (Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 103-5.

Varma M, Rudolph DL, Knuchel M, Switzer WM, Hadlock KG, Velligan M et al. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2

infections by *Western blot* (Immunoblot) assay containing recombinant envelope glycoproteins. J Clin Microbiol. 1995; 33: 3239-44.

Verdonck K, González E, Maldonado F, Agapito D, Doorend SV, Vandamme AM et al. Comparison of three ELISAs for the routine diagnosis of human T-lymphotropic virus infection in a high-prevalence setting in Peru. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; 103(4): 420-2.

Vet JAM, Majithia AR, Marras SAE, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ et al. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(11): 6394-9.

Visconti A, Visconti L, Belloc R, Binkin N, Colucci G, Vernocchi L et al. HTLV-II/HIV-1 coinfections and risk for progression to AIDS among intravenous drug users. J Acq Imm Def Syndr Hum Retrovirol. 1993; 6: 1228-37.

Vitone F, Gibellini D, Schiavone P, D'Antuono A, Gianni L, Bon I et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) prevalence and quantitative detection of DNA proviral load in individuals with indeterminate/positive serological results. BMC Infect Dis. 2006; 6:41. [acesso em 21 jun. 2010]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/6/41>

Vrielink H, Zaaijer HL, Cuypers HTM, van der Poel CL, Woerdeman M, Lelie PN et al. Evaluation of a new HTLV-I/II polymerase chain reaction. Vox Sang. 1997; 72: 144-7.

Wiktor SZ, Alexander SS, Shaw GM, Weiss SH, Murphy EL, Wilks RJ et al. Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by *Western blot*. Lancet. 1990; 335: 1533.

Wiktor SZ, Pate EJ, Weiss SH, Gohd RS, Correa P, Fontham ET et al. Sensitivity of HTLV-I antibody assays for HTLV-II. Lancet. 1991; 338: 512-3.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79: 2031-5.

Zehender G, De Maddalena C, Osio M, Cavalli B, Parravicini C, Moroni M et al. High prevalence of HTLV-II infection in patients affected by HIV-1 associated predominantly sensory polyneuropathy (PSP). *J Infect Dis*. 1995; 172: 1595-8.

Zehender G, De Maddalena C, Gianotto M, Cavalli B, Santambrogio S, Orso M et al. High prevalence of false-negative anti-HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997; 13(13): 1141-6.

Zella D, Mori L, Sala M, Ferrante P, Casoli C, Bertazzoni U et al. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus and type II infection in Italian drug abusers. *Lancet*. 1990; 336: 575-6.

Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G, Bosman F et al. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998; 5(1): 45-9.

Anexo 1: Características dos dois ensaios imunoenzimáticos de 2ª e 3ª geração utilizados na triagem sorológica para HTLV-1/2 no IAL de 2007 a 2010.

Características	EIA 2ª geração	EIA 3ª geração
	BioELISA HTLV-I+II, Biokit	Murex HTLV-I+II, Abbott
Anticorpo detectado	IgG	IgG, IgM, IgA
Antígeno	Segmentos antigênicos recombinantes de HTLV-1 e HTLV-2	Peptídeos sintéticos de proteínas do envelope de HTLV-1 e -2 e de proteína transmembrana recombinante de HTLV-2
Tempo total de incubação (min)	105	90
Ponto de corte (<i>Cut-off</i>)	$0,450 + \bar{X}$ CN	$0,200 + \bar{X}$ CN
Comprimento de onda (nm)	490 – 492	450
Espécime clínico utilizado	Soro/plasma	Soro/plasma
Fase sólida	Microplaca	Microplaca
Resultados	Qualitativo	Qualitativo
Princípio do ensaio	Indireto	Sanduíche
Substrato	OPD	TMB
Sensibilidade (%)	> 99,70	100
Especificidade (%)	> 99,00	99,75
Aprovação do FDA	Não	Não
Disponibilidade no mercado brasileiro	Sim	Sim

Legenda: EIA: ensaio imunoenzimático; $\bar{X}$ CN: média das absorvâncias dos controles negativos; TMB: tetrametilbenzidina; OPD: o-fenilenodiamina; FDA: *Food and Drug Administration*. Valores de sensibilidade e especificidade de acordo com os fabricantes. Valores de $DO/Cut-off \geq 1,0$ consideradas amostras reagentes.

Anexo 2: Aprovação do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



Projeto nº 0010D-2010/BM

**Avaliação de novo algoritmo de testes laboratoriais a ser usado no diagnóstico de
infecção por HTLV-I e HTLV-II no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo**

Coordenação: Adele Caterino de Araujo

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico pela CCD-BM e após aprovação quanto aos aspectos éticos pela Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz/CEPIAL.


ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 04 de Março de 2010

1ª via: CTC/IAL
2ª via: CCD
3ª via: Coordenador

Anexo 3: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859



São Paulo, 07 de agosto de 2009.

Protocolo: 59/2009

Projeto de Pesquisa nº: CCD-BM 33/07 – Avaliação de novo algoritmo de testes laboratoriais a ser usado no diagnóstico de infecção por HTLV-I E HTLV-II no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Pesquisador Responsável: **Adele Catarino de Araujo**

Prezado Pesquisador:

O Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em sua reunião ordinária de **03 de julho de 2009**, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado e deliberou na condição de **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade à Resolução 196/96 são deveres de(a) pesquisador(a): **a)** comunicar de imediato, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração, depois da manifestação do CEPIAL; **b)** manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, no caso de eventual auditoria; **c)** comunicar formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto; **d)** elaborar e apresentar relatórios parciais e finais; **e)** justificar perante o CEPIAL, a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - **CEPIAL**

Anexo 4: Jacob et al., 2009.

Journal of Virological Methods 159 (2009) 288–290



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Short communication

Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in “at-risk” individuals from São Paulo, Brazil

Fabrício Jacob^a, Mariana C. Magri^{a,b}, Emanuela A.S. Costa^a,
Elizabeth Santos-Fortuna^a, Adele Caterino-de-Araújo^{a,b,*}

^aImmunology Department, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, 01246-902, São Paulo, SP, Brazil

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira,” 05508-000, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP, Brazil

A B S T R A C T

Article history:

Received 27 January 2009

Received in revised form 23 March 2009

Accepted 25 March 2009

Available online 5 April 2009

Keywords:

Human T-cell lymphotropic virus type 1

and 2 (HTLV-1/2)

Enzyme immunoassay (EIA)

Diagnosis

Signal-to-cutoff (S/C) value

Brazil

Data obtained during routine diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and 2 (HTLV-2) in “at-risk” individuals from São Paulo, Brazil using signal-to-cutoff (S/C) values obtained by first, second, and third generation enzyme immunoassay (EIA) kits, were compared. The highest S/C values were obtained with third generation EIA kits, but no correlation was detected between these values and specific antibody reactivity to HTLV-1, HTLV-2, or untyped HTLV ($p = 0.302$). In addition, use of these third generation kits resulted in HTLV-1/2 false-positive samples. In contrast, first and second generation EIA kits showed high specificity, and the second generation EIA kits showed the highest efficiency, despite lower S/C values. Using first and second generation EIA kits, significant differences in specific antibody detection of HTLV-1, relative to HTLV-2 ($p = 0.019$ for first generation and $p < 0.001$ for second generation EIA kits) and relative to untyped HTLV ($p = 0.025$ for first generation EIA kits), were observed. These results were explained by the composition and format of the assays. In addition, using receiver operating characteristics (ROC) analysis, a slight adjustment in cutoff values for third generation EIA kits improved their specificities and should be used when HTLV “at-risk” populations from this geographic area are to be evaluated.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Currently, diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 (HTLV-1) and 2 (HTLV-2) is performed by detecting HTLV-specific antibodies in sera. Several enzyme immunoassay (EIA) kits available commercially are employed currently for this purpose, and most of these kits utilize processed proteins as antigens (e.g., Gag and Env proteins of both HTLV-1 and HTLV-2). Initially, EIA kits used only HTLV-1 viral lysates for the detection of specific antibodies (first generation). Subsequently, these first generation kits were replaced by assays that employed HTLV-1 and/or HTLV-2 viral lysates plus recombinant proteins and/or synthetic peptides

of HTLV-1 and HTLV-2, or recombinant proteins and/or synthetic peptides of HTLV-1 and HTLV-2 isolates (second generation). More recently, third generation EIA kits have been developed; these kits use recombinant and/or synthetic peptides of HTLV-1 and HTLV-2 as antigens and make use of a sandwich format. Despite these improvements, the EIA kits were incapable of discriminating and identifying quantitatively the antibodies produced in response to the array of antigens from HTLV-1 and HTLV-2. According to the manufacturers' instructions, serum samples were considered positive for the presence of HTLV-1/2 antibodies when the signal-to-cutoff (S/C) values were ≥ 1 . Nevertheless, the optimum cutoff value for each EIA kit may vary, depending on the tested population and the geographical region where the test is performed (e.g., based on polyclonal stimulation due to parasitic infections in tropical countries).

Several problems in the correct identification of HTLV-1-negative samples have been described (Beck et al., 1996; Fujiyama et al., 1995; Jacob et al., 2007; Karopoulos et al., 1993). Previous studies conducted in São Paulo, Brazil noted serological testing problems in diagnosing HTLV-1 and -2 infections in HIV/AIDS and HTLV out-patients and emphasized the need for two EIA tests for

Abbreviations: HTLV-1, human T-cell lymphotropic virus type 1; HTLV-2, human T-cell lymphotropic virus type 2; EIA, enzyme immunoassay; S/C, signal-to-cutoff; WB, western blot; ROC, receiver operating characteristics; PCR, polymerase chain reaction; OPD, o-phenylenediamine; TMB, tetramethylbenzidine; BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; NBT, nitroblue tetrazolium.

* Corresponding author at: Immunology Department, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, 01246-902, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30682898; fax: +55 11 30682898.

E-mail addresses: caterino@ial.sp.gov.br, caterino@usp.br (A. Caterino-de-Araújo).

0166-0934/\$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jviromet.2009.03.024

Anexo 4 cont.

F. Jacob et al. / Journal of Virological Methods 159 (2009) 288–290

289

Table 1
EIA kits employed in the diagnosis of HTLV-1/2, according to antigen composition and assay format.

Generation format	Kit's name	Antigen	Conjugate/substrate
EIA first Indirect	Hemobio HTLV 1/2 HBK 424	HTLV-1 and HTLV-2 viral lysates	Anti-IgG ^a peroxidase/TMB
EIA first Indirect	Platelia [®] HTLV-1 New	HTLV-1 viral lysate	Anti-IgG and anti-IgM ^a peroxidase/OPD
EIA first Indirect	Vironostika [®] HTLV-1/2	HTLV-1 viral lysate	Anti-IgG ^a peroxidase/TMB
EIA second Indirect	Hemagen HTLV1+2	HTLV-1 viral lysate + gp46 and p21E	Anti-IgG and anti-IgM ^a peroxidase/TMB
EIA second Indirect	Vironostika [®] HTLV-1/2	HTLV-1 and HTLV-2 viral lysates + p21E	Anti-IgG ^a peroxidase/TMB
EIA third Sandwich	Ortho [®] HTLV-1/HTLV-2	Two core recombinant proteins and viral env	Two core recombinant proteins and viral env ^a peroxidase/OPD
EIA third Sandwich	Murex HTLV 1+2	HTLV-1 and -2 gp46+HTLV-2 gp21	HTLV-1 and -2 gp46+HTLV-1 gp21 ^a peroxidase/TMB
WB Indirect	HTLV Blot 2.4, Genelabs	HTLV-1 viral lysate + rgp46-l, rgp46-2 and GD21	Anti-IgG ^a alkaline phosphatase/BCIP and NBT

OPD: o-phenylenediamine; TMB: tetramethylbenzidine; BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; NBT: nitroblue tetrazolium.

^a Denotes enzyme conjugation.

screening with different antigen composition and formats and the use of the polymerase chain reaction (PCR) as a confirmatory assay (Caterino-de-Araujo, 2009; Jacob et al., 2007, 2008). Since December 1998, the Immunology Department of Instituto Adolfo Lutz of São Paulo has offered HTLV-1/2 serological testing to Public Health Units that assist HTLV “at-risk” individuals. From December 1998 to March 2006, 2312 serum samples from 791 females and 1521 males, aged 21–50 years, were tested for HTLV-1/2 antibodies using two EIA kits, one of which contained HTLV-1 viral lysates. The serum samples came from AIDS Reference Centers ($n=1393$) and HTLV out-patient clinics ($n=919$). Table 1 presents the commercially available EIA kits that were employed during this period and their format and composition. All reactions were conducted according to manufacturer's instructions, and the serum samples that resulted in S/C values ≥ 1 were considered positive. Sera that tested positive on at least one EIA were confirmed by western blot 2.4 (WB), which was used as the “gold standard” for selecting and discriminating HTLV-1/2-positive samples. Briefly, the obtained results disclosed 461 reactive sera upon EIA screening, of which 166 showed discordant results. WB analysis disclosed HTLV-1/2-positive results in 19 out of 166 EIA-discordant sera (11.4%) and confirmed the presence of HTLV-1 in 134 (29.1%) sera, HTLV-2 in 68 (14.8%) sera, untyped HTLV in 14 (3%) sera, and HTLV-1 and HTLV-2 in 3 (0.7%) sera. The remaining 79 (17.1%) sera were negative for HTLV infection by WB analysis. None of the tested EIA kits (first, second or third generation) were able to detect all HTLV-1/2-positive samples. The highest sensitivity among EIAs was recorded for the third generation EIA kits, and the highest specificity and efficiency were detected for second generation EIA kits (data published previously, Jacob et al., 2007, 2008). No significance was calculated for S/C values. Thus it was decided to analyze the same samples according to S/C values in order to facilitate interpretation of results. GraphPad Prism software version 5 (San Diego, CA) was used for statistical analysis. Association between antibody detection (S/C values) and WB results was assessed by Kruskal–Wallis ANOVA test and Mann–Whitney *U*-test. Results were considered significant when $p \leq 0.05$. Receiver operating characteristics (ROC) tests were performed to determine an adequate cutoff value.

According to S/C values obtained from 461 serum samples, no correlation with age, gender, or “at-risk” population group was observed (data not shown). In contrast, a modest correlation of S/C values with the EIA kit employed was detected: high S/C values were identified by third generation EIA kits, independently of the WB results (positive, indeterminate, or negative), in contrast to the lower S/C values in HTLV-negative samples evaluated by first and second generation EIA kits (Fig. 1A). Concerning HTLV-positive sera, differences in S/C values in HTLV-1 samples were detected when first and second generation EIA kits were employed. Interestingly, no differences were obtained among untyped HTLV-, HTLV-1-, and HTLV-2-positive samples by third generation EIA kit analysis (Fig. 1B). Given these results, it is likely that S/C values reflect the antibody response to the specific antigens used in the composition

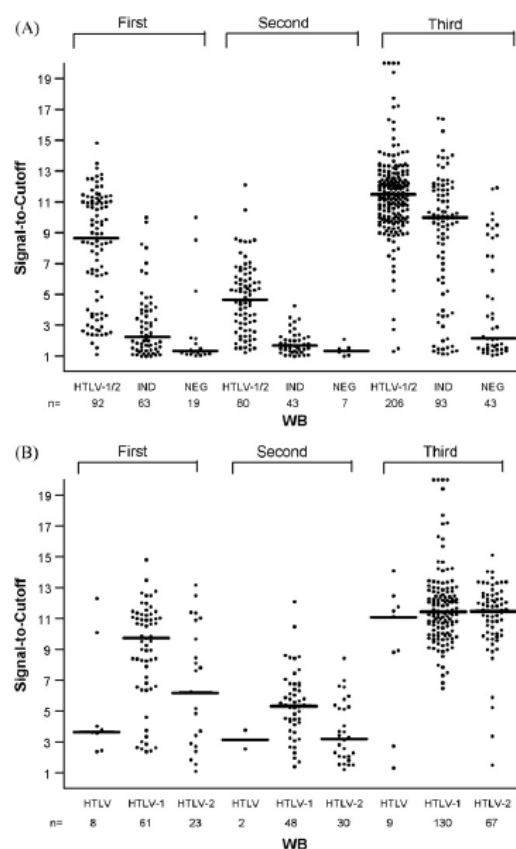


Fig. 1. Signal-to-cutoff (S/C) values, according to WB 2.4 results for each EIA kit generation (first, second, or third) employed in the detection of HTLV-1/2 antibodies. Panel A: comparative analysis of S/C values obtained for HTLV-1/2, IND, and NEG samples by each EIA generation ($p < 0.001$ for comparisons of all groups within each EIA generation). Statistically significant results were also found for HTLV-1/2 vs. HTLV-1/2 ($p < 0.001$), IND vs. IND ($p < 0.001$), and NEG vs. NEG ($p = 0.002$) among first, second, and third EIA generations (by Kruskal–Wallis ANOVA). Panel B: comparative analysis of S/C values obtained among HTLV ($p = 0.199$), HTLV-1 ($p < 0.001$), and HTLV-2 ($p < 0.001$) groups in first, second, and third EIA generations. Comparative analysis of HTLV vs. HTLV-1 vs. HTLV-2 ($p = 0.011$) for first generation EIA, HTLV vs. HTLV-1 vs. HTLV-2 ($p = 0.002$) for second generation EIA, and HTLV vs. HTLV-1 vs. HTLV-2 ($p = 0.302$) for third generation EIA was also performed (Kruskal–Wallis ANOVA). Comparative analysis of HTLV-1 vs. HTLV groups ($p = 0.025$) for first generation EIA, HTLV-1 vs. HTLV ($p = 0.140$) for third generation EIA, HTLV-1 vs. HTLV-2 ($p = 0.019$) for first generation EIA, HTLV-1 vs. HTLV-2 ($p < 0.001$) for second generation EIA, and HTLV-1 vs. HTLV-2 ($p = 0.574$) for third generation EIA (by Mann–Whitney *U*-test).

Anexo 4 cont.

290

F. Jacob et al. / Journal of Virological Methods 159 (2009) 288–290

of each EIA kit. While first and second generation EIA kits contain HTLV-1 viral lysates (which provide targets for a wider range of HTLV-1 antibodies), third generation EIA kits, which have only recombinant and/or synthetic peptides from both viruses, result in the same level of antibody detection in untyped HTLV-, HTLV-1-, and HTLV-2-positive samples. Nevertheless, the high sensitivity of third generation EIA kits, because of their sandwich format and ability to bind cross-reactive antigens, may be responsible for false-positive results as well.

These data are in accordance with data obtained in other studies. For example, Karopoulos et al. (1993) compared the performance of nine anti-HTLV-1 screening assays available commercially (eight of which were EIAs), testing a panel of sera characterized as positive or negative by WB or radioimmunoprecipitation assay, and found some difficulty in identifying anti-HTLV-1-negative sera correctly. Similar results were observed by Fujiyama et al. (1995) upon testing nine EIA kits on positive and negative samples characterized by immunofluorescence assays and PCR. These authors attributed the false-positive results obtained by EIA recombinant kits to an inadequate cutoff value. Beck et al. (1996) tested Brazilian samples with two EIA kits and adjusted the cutoff value to the point that gave the highest sensitivity in conjunction with the lowest false-positive result rate using an ROC curve, but this strategy is not used in routine diagnosis in Brazil.

In the present study, using ROC analysis of HTLV-positive and -negative samples, a slight adjustment in cutoff values of third generation EIA kits (resulting in $S/C > 2.1$) improved the specificity of such assays by 7.8%. No adjustment was made in cutoff values for first and second generation EIA kits, since ROC analysis disclosed that the cutoff values suggested by the manufacturers are nearly identical to the optimum cutoff values.

Apart from the specificity problems with EIA kits, high sensitivity of screening tests could be obtained using two concomitant EIAs of different antigen composition and format. This strategy has been suggested and employed in South America, a region considered endemic for HTLV-1 and HTLV-2 infections (Berini et al., 2008; Caterino-de-Araujo, 2009; Caterino-de-Araujo et al., 1998; de-Araujo et al., 1994; Jacob et al., 2007, 2008).

Recently, a sequential use of two EIAs for HTLV-1/2 screening was suggested for blood banks in Southern Africa (Samo Gudo et al., 2008). These investigators utilized WB on HTLV-positive specimens with discordant EIA results, only considering specimens with S/C values greater than 2.0 for WB analysis. This study corroborates, in part, the approach used in the present study, including the use of an S/C value > 1 .

In summary, taking into account the results obtained from HTLV “at-risk” individuals from São Paulo, Brazil and data from the lit-

erature, the use of two concomitant EIA kits of different formats and compositions for screening and an adjustment in cutoff values is suggested for the accurate diagnosis true HTLV-1/2-infected individuals.

Acknowledgments

Fabício Jacob and Emanuela Avelar Silva Costa are Master of Science students from Coordenadoria de Controle de Doenças – SES, Mariana Cavalheiro Magri is a Doctor of Pharmacy student from Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, all fellowships are from CAPES, Brazil. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, a fellowship to Adele Caterino-de-Araujo (PD#304372/2006-4), and Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil, Projects 04/05 and 34/07.

References

- Beck, A., Lima, M.C., Castro, M.C., Drummond, D.X., Oliveira, M.L., Oelemann, W., Pauli, G., van Tilburg Bernardes, Y.S., 1996. Performance of HTLV-1 screening assays in Brazil. *Zentralbl. Bakteriol.* 283, 340–346.
- Berini, C.A., Pascuccio, S., Bautista, C.T., Gendler, S.A., Eirin, M.E., Rodrigues, C., Pando, M.A., Biglione, M.M., 2008. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J. Virol. Methods* 147, 322–327.
- Caterino-de-Araujo, A., 2009. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J. Virol. Methods* 156, 150–151.
- Caterino-de-Araujo, A., Santos-Fortuna, E., Zandoná-Meleiro, M.C., Suleiman, J., Calabró, M.L., Favero, A., De Rossi, A., Chieco-Bianchi, L., 1998. Sensitivity of two ELISA tests in relation to western blot in detecting HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 173–182.
- de-Araujo, A.C., Casseb, J.S.R., Neitzert, E., Xavier de Souza, M.L., Mammano, F., Del Mistro, A., De Rossi, A., Chieco-Bianchi, L., 1994. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur. J. Epidemiol.* 10, 165–171.
- Fujiyama, C., Fujiyoshi, T., Matsumoto, D., Tamashiro, H., Sonoda, S., 1995. Evaluation of commercial HTLV-1 test kits by a standard HTLV-1 serum panel. *Bull. World Health Organ.* 73, 515–521.
- Jacob, F., Santos-Fortuna, E., Azevedo, R.S., Caterino-de-Araujo, A., 2007. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 49, 361–364.
- Jacob, F., Santos-Fortuna, E., Azevedo, R.S., Caterino-de-Araujo, A., 2008. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J. Clin. Virol.* 42, 149–155.
- Karopoulos, A., Silvester, C., Dax, E.M., 1993. A comparison of the performance of nine commercially available anti-HTLV-I screening assays. *J. Virol. Methods* 45, 83–91.
- Samo Gudo, E., Abreu, C.M., Mussá, T., Augusto, A.R., Otsuki, K., Chambo, E., Amade, N., Tanuri, A., Ferreira, O.C., Jani, I.L., 2008. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo city, Mozambique. *Transfusion*, doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02100.x.

Anexo 5: Costa et al., 2009.

NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE

Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco**Lack in introducing a new algorithm of laboratorial tests for detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections in at-risk population**

RIALA6/1224

Emanuela Avelar Silva COSTA^{1,2}, Fabricio JACOB^{1,2}, Regiane dos Santos FELICIANO², Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA^{1,2}, Adele CATERINO-DE-ARAUJO^{1,2*}

*Endereço para correspondência: Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: caterino@ial.sp.gov.br

¹Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências, São Paulo, SP, Brasil.

²Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.
Recebido: 02.06.2009 Aceito para publicação: 26.08.2009

RESUMO

Em vista dos problemas detectados no diagnóstico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foi proposto um novo algoritmo de testes laboratoriais que utiliza duas amostras de sangue sequenciais. Na primeira o sangue é coletado em tubo seco e feita triagem sorológica com dois ensaios imunoenzimáticos (EIAs). Na segunda, o sangue é coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) para a repetição dos EIAs e para os testes confirmatórios de Western blot (WB) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos com 313 amostras de sangue mostraram ineficiência do algoritmo, pois nos casos EIA reagentes, apenas 25% tiveram uma segunda amostra de sangue coletada e destas, apenas três em EDTA. Portanto, não foi possível comparar o desempenho da PCR em relação ao WB. Um algoritmo simples, de coleta única de sangue em tubo contendo EDTA foi proposto e vem sendo utilizado para a triagem e para os testes confirmatórios.

Palavras-chave. vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1); vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2); diagnóstico; sorologia; ensaio imunoenzimático (EIA); Western blot (WB); reação em cadeia da polimerase (PCR); algoritmo de testes laboratoriais.

ABSTRACT

Taking into account the problems on the human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) laboratory diagnosis in samples analyzed at Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, it was proposed a new algorithm employing two blood samples serially collected. The first serum sample was for serological screening using two enzyme immunoassays (EIAs), and the second blood sample collected on EDTA was for retesting EIAs and to confirm HTLV-1/2 infection by Western blot (WB) and polymerase chain reaction (PCR). The results obtained on 313 blood samples showed inefficiency of this algorithm as only 25% of EIAs positive samples had a second blood sample collected, and of which the blood were correctly collected on EDTA from three patients only. No feasible data were achieved to compare the actual performance of PCR in relation to WB. Thus, we started to use a simple algorithm (one step) for diagnosing HTLV-1/2 on a single blood sample collected on EDTA for screening and confirmatory assays.

Key words. human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2); diagnosis; serology; enzyme immunoassay (EIA); Western blot (WB); polymerase chain reaction (PCR); algorithm tests.

Anexo 5 cont.

Costa EAS, Jacob F, Feliciano RS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. *Rev Inst Adolfo Lutz*, São Paulo, 68(2):314-7, 2009.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) se baseia na pesquisa de anticorpos específicos no soro ou de segmentos de DNA proviral em células do sangue periférico. O algoritmo de testes laboratoriais recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para HTLV-1 e HTLV-2 difere quando se trata de Laboratórios de Diagnóstico e Unidades de Hemoterapia. No primeiro caso, o Ministério da Saúde recomenda a pesquisa de anticorpos no soro usando um ensaio imunoenzimático (EIA) e em amostras reagentes, a repetição em duplicata do EIA antes de submeter o soro ao teste confirmatório de imunofluorescência indireta (IFI) ou Western blot (WB). Para os Hemocentros, o Ministério da Saúde não obriga a realização de teste confirmatório e os doadores de sangue cujos soros resultaram reagentes no EIA são encaminhados a Ambulatórios de Especialidades, para avaliação clínica e confirmação diagnóstica¹.

Desde novembro de 1998, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (IAL/CCD/SES-SP) vem realizando a sorologia para HTLV-1/2 em população de risco e tem observado problemas no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2²⁻⁶. O algoritmo adotado pelo Instituto Adolfo Lutz difere do recomendado pelo Ministério da Saúde, pois usa dois testes EIA de composição antigênica e formatos diferentes na triagem sorológica. Isto porque nenhum EIA disponível no comércio (1ª, 2ª ou 3ª geração) é capaz de detectar todos os casos verdadeiramente soropositivos para a infecção por HTLVs². Apesar da melhora na composição dos kits EIA que tem aumentado sua sensibilidade e especificidade, um grande número de soros com padrão indeterminado no teste confirmatório de WB continua sendo observado⁷⁻¹⁰. No Instituto Adolfo Lutz, cerca de 30% dos soros de população de risco apresenta perfil indeterminado à análise pelo WB³.

Recentemente, foi proposto um novo algoritmo de testes laboratoriais para ser usado pelo Instituto Adolfo Lutz (Figura 1)¹¹. Este algoritmo tomou como base o algoritmo proposto pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde são solicitadas duas amostras sequenciais de sangue¹². Para o HTLV-1/2, a primeira amostra de sangue deve ser colhida em tubo seco e o soro testado quanto à presença de anticorpos específicos por

dois EIAs. Em soros reagentes em pelo menos um EIA, uma segunda amostra de sangue deve ser solicitada e o sangue coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Nesta amostra de sangue, o plasma é usado para repetir a triagem sorológica (dois EIAs) e nos casos reagentes, os soros submetidos ao ensaio de WB. A fração de células do sangue periférico (PBL) é utilizada para a pesquisa de segmentos de DNA de HTLV-1/2 (região *tax* do genoma proviral) pela reação em cadeia da polimerase (PCR)¹³⁻¹⁵. Os produtos da PCR são analisados quanto a fragmentos de restrição enzimática (PCR-RFLP) usando a enzima *Taq I* que apresenta sítio em fragmento *tax* de HTLV-2 e, portanto, discrimina HTLV-1 de HTLV-2. Esta estratégia de coleta sequencial de sangue evita resultados falsos (positivo e negativo) por falha humana de identificação e / ou manuseio das amostras de sangue e, possibilita comparar o desempenho do WB em relação à PCR em população de risco.

Um estudo preliminar usando este algoritmo foi realizado com 313 amostras de soro recentemente encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise. As amostras eram provenientes de Centros de Referência e Treinamento em AIDS (14,4%) e de Ambulatórios de Especialidades do SUS (85,6%). Das 313 amostras de soro analisadas, 36 resultaram pelo menos um EIA reagente (11,5%) sendo requisitada nova coleta de sangue à respectiva unidade de origem dos pacientes. Uma segunda amostra de sangue foi coletada somente de 9 (25%) pacientes, sendo que em apenas três (33%) pacientes o sangue foi coletado corretamente. Isto mostrou ineficiência do algoritmo proposto, não havendo entrosamento entre Laboratório, Unidade solicitante, médico e paciente. No entanto, os pacientes tiveram seus soros analisados pelo teste confirmatório de WB e 35% deles resultaram WB indeterminados, mostrando a necessidade de se implantar a PCR para a confirmação de infecção por HTLV-1/2. Infelizmente, o pequeno número de amostras de PBL (três) não permitiu comparar os resultados do WB com os da PCR. Porém este estudo mostrou que o algoritmo proposto, embora útil em pesquisa, é totalmente inadequado para ser usado na rotina diagnóstica e ele foi substituído por um algoritmo mais simples, de etapa única, onde o sangue é coletado em tubo contendo EDTA e usado para a triagem sorológica e para os testes confirmatórios (2ª etapa da Figura 1). Estudos futuros poderão mostrar a eficácia deste novo algoritmo para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em população de risco de São Paulo e mensurar custo/

Anexo 5 cont.

Costa EAS, Jacob F, Feliciano RS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. *Rev Inst Adolfo Lutz*, São Paulo, 68(2):314-7, 2009.

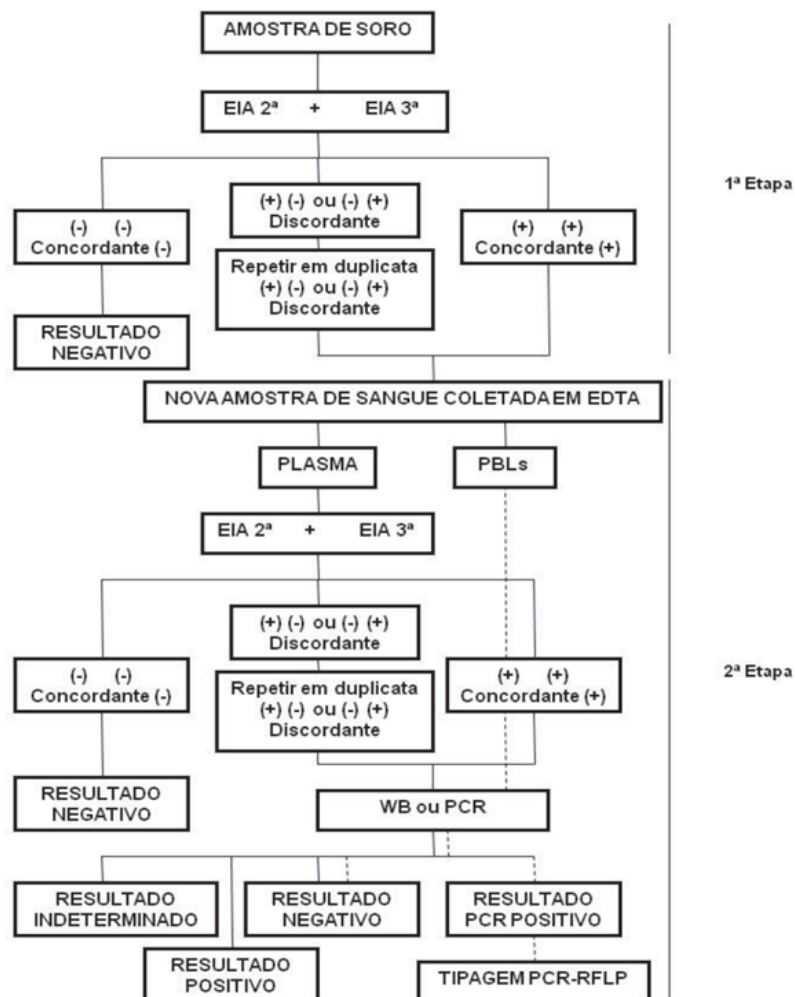


Figura 1. Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 utilizado pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Legenda: +: soro reagente; -: soro não reagente; EIA: ensaio imunoenzimático; EIA 2ª: EIA de segunda geração; EIA 3ª: EIA de terceira geração; PBL: células do sangue periférico; WB: Western blot; PCR: reação em cadeia da polimerase; PCR-RFLP: análise de produto de PCR por polimorfismo de restrição enzimática.

Anexo 5 cont.

Costa EAS, Jacob F, Feliciano RS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. *Rev Inst Adolfo Lutz*, São Paulo, 68(2):314-7, 2009.

benefício dos testes confirmatórios de PCR e WB. Há que se ressaltar o alto custo do kit disponível no mercado de WB (WB 2.4, Genelabs Diagnostic, Singapore), cujo custo aproximado é de US\$ 240,00 por tira, e o alto número de soros com padrão indeterminado para a infecção por HTLV-1/2 ao se utilizar este kit.

O conhecimento do real status de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 é importante para direcionar a conduta clínica e terapêutica do paciente¹⁶. O HTLV-1 está relacionado com doenças graves como a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 e a leucemia de células T do adulto, enquanto o HTLV-2 é reconhecidamente menos patogênico¹⁷. Portanto, o diagnóstico diferencial é de suma importância. Além disto, em países onde o HTLV-1 e o HTLV-2 são endêmicos e onde os isolados virais podem divergir dos isolados empregados na composição dos kits utilizados na detecção de anticorpos específicos⁷, há necessidade de se verificar qual o melhor teste confirmatório para ser usado no diagnóstico. Estudos de novas metodologias e algoritmos de diagnóstico são importantes para a saúde pública e são desafios que se impõem à Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Suporte: Bolsas de Mestrado CAPES para EASC e FJ; Bolsa PAPS/SP para RSF; Bolsa de Produtividade em Pesquisa MCT/CNPq para ACA # 304372/2006-4; Auxílio Financeiro CCD-SES/SP, MCT/CNPq Universal # 481040/2007-2 e IAL # 33/07. Trabalho parcialmente apresentado na 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses, Salvador, Ba, July 1 – 4, 2009.

REFERÊNCIAS

- Ministério da Saúde. HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em Unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998. II (Série TELELAB); 54p.
- Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 2007; 49: 361-4.
- Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008; 42: 149-55.
- Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista. 2008; 5: 12-8.
- Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in "at-risk" individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2009; 159: 288-90.
- Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods*. 2009; 156: 150-1.
- Mahieux R, Horal P, Maucière P, Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Meertens L, Murphy E, Gessain A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 gag indeterminate Western blot patterns in Central Africa: relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 4049-57.
- Berini CA, Eirin ME, Pando MA, Biglione MM. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *J Med Virol*. 2007; 79: 69-73.
- Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, Caterino-de-Araujo A. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med trop São Paulo*. 2007; 49(4): 225-30.
- Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sen L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol*. 2004; 74: 323-7.
- Jacob F. Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise. [Dissertação de Mestrado] São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2007. 103 pp.
- Ministério da Saúde. Portaria nº 34, de jul. 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 29 de jul. 2005. Procedimentos seqüenciados para realização do diagnóstico da infecção pelo HIV utilizando-se testes rápidos em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses. [Regulamenta o uso de testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais].
- Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 44: 185-9.
- Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sen L, Medeiros S. Usefulness of a Nested-Polymerase Chain Reaction for Molecular Diagnosis of Human T-cell Lymphotropic Virus Type I/II. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(4): 377-80.
- Gudo ES, Abreu CM, Mussá T, Augusto AR, Otsuki K, Chambo E, Amade N, Tanuri A, Ferreira OC, Jani IL. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo city, Mozambique. *Transfusion*. 2008; 49(6): 1146-50.
- Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33: 1395-401.
- Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP, Sanabani S, Marchiori PE, Duarte AJS, Penalva-de-Oliveira AC. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) associated myelopathy development in HTLV-I-infected subjects in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(3): 273-6.

Anexo 6: Resultados obtidos pelos testes confirmatórios sorológico e moleculares empregados no diagnóstico de HTLV-1/2 em 73 amostras de sangue encaminhadas ao IAL para análise (2007 a 2010).

Amostra (n=73)	Gênero	Idade	WB 2.4	PCR convencional		PCR em tempo real	Ct			Interpretação final
	(M/F)	(anos)	Resultado	tax	pol	pol	-1	-2	Alb	
IAL-1	M	29	HTLV	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	36	26	HTLV-2
IAL-2	M	62	HTLV	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	40	0	25	HTLV-1
IAL-3	M	62	HTLV	-	-	-	0	0	28	HTLV
IAL-4	F	41	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	40	0	26	HTLV-1
IAL-5	F	55	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	33	0	28	HTLV-1
IAL-6	F	47	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	41	0	29	HTLV-1
IAL-7	F	33	HTLV-1	-	-	-	0	0	28	HTLV-1
IAL-8	F	27	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	36	0	27	HTLV-1
IAL-9	F	47	HTLV-1	-	-	-	0	0	32	HTLV-1
IAL-10	F	57	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	32	0	26	HTLV-1
IAL-11	F	32	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	41	0	32	HTLV-1
IAL-12	F	38	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	29	0	24	HTLV-1
IAL-13	M	43	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	29	0	24	HTLV-1
IAL-14	M	45	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	32	0	25	HTLV-1
IAL-15	F	42	HTLV-1	-	-	-	0	0	31	HTLV-1
IAL-16	M	45	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	37	0	35	HTLV-1
IAL-17	M	50	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	36	0	30	HTLV-1
IAL-18	F	42	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	34	0	29	HTLV-1
IAL-19	F	56	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	35	0	27	HTLV-1
IAL-20	F	43	HTLV-1	-	-	-	0	0	32	HTLV-1
IAL-21	F	47	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	36	0	36	HTLV-1
IAL-22	M	33	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	28	0	21	HTLV-1
IAL-23	F	43	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	27	0	22	HTLV-1
IAL-24	M	37	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	33	0	22	HTLV-1
IAL-25	F	40	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	30	0	24	HTLV-1
IAL-26	M	41	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	29	0	22	HTLV-1
IAL-27	M	65	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	27	0	22	HTLV-1
IAL-28	M	46	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	34	27	HTLV-2
IAL-29	M	41	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	37	27	HTLV-2
IAL-30	M	36	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	39	30	HTLV-2
IAL-31	M	47	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	35	27	HTLV-2
IAL-32	F	62	HTLV-2	-	-	-	0	0	27	HTLV-2
IAL-33	M	21	HTLV-2	-	-	-	0	0	31	HTLV-2
IAL-34	M	38	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	33	26	HTLV-2
IAL-35	F	38	HTLV-2	-	-	-	0	0	26	HTLV-2
IAL-36	M	51	HTLV-2	-	-	-	0	0	31	HTLV-2

Anexo 6 cont.

Amostra (n=73)	Gênero	Idade	WB 2.4	PCR convencional		PCR em tempo real	Ct			Interpretação final
				tax	pol		-1	-2	Alb	
IAL-37	M	47	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	36	33	HTLV-2
IAL-38	M	46	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	36	30	HTLV-2
IAL-39	M	52	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	35	31	HTLV-2
IAL-40	F	47	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	31	26	HTLV-2
IAL-41	F	37	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	36	25	HTLV-2
IAL-42	F	37	HTLV-2	-	-	-	0	0	27	HTLV-2
IAL-43	M	54	HTLV-2	-	-	-	0	0	26	HTLV-2
IAL-44	F	43	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	32	23	HTLV-2
IAL-45	M	47	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	30	22	HTLV-2
IAL-46	F	32	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	29	22	HTLV-2
IAL-47	F	50	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	35	23	HTLV-2
IAL-48	F	27	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	29	23	HTLV-2
IAL-49	M	47	Ind.	-	-	-	0	0	30	-
IAL-50	M	37	Ind.	-	-	-	0	0	33	-
IAL-51	F	39	Ind.	-	-	-	0	0	26	-
IAL-52	F	51	Ind.	-	-	-	0	0	26	-
IAL-53	M	20	Ind.	-	-	-	0	0	22	-
IAL-54	F	33	Ind.	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	35	26	HTLV-2
IAL-55	M	58	Ind.	-	-	-	0	0	26	-
IAL-56	F	46	Ind.	-	-	HTLV-2	0	40	26	HTLV-2
IAL-57	M	42	Ind.	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	38	34	HTLV-2
IAL-58	M	40	Ind.	-	-	-	0	0	32	-
IAL-59	M	35	Ind.	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	0	34	28	HTLV-2
IAL-60	F	22	Ind.	-	-	-	0	0	22	-
IAL-61	F	62	Ind.	-	-	-	0	0	26	-
IAL-62	M	53	Ind.	-	-	-	0	0	29	-
IAL-63	F	23	Ind.	-	-	-	0	0	28	-
IAL-64	F	51	Ind.	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	36	0	31	HTLV-1
IAL-65	M	41	-	-	-	-	0	0	22	-
IAL-66	M	36	-	-	-	-	0	0	22	-
IAL-67	F	35	-	-	-	-	0	0	22	-
IAL-68	M	41	-	-	-	-	0	0	22	-
IAL-69	M	53	-	-	-	-	0	0	23	-
IAL-70	M	33	-	-	-	-	0	0	22	-
IAL-71	F	23	-	-	-	-	0	0	28	-
IAL-72	M	27	-	-	-	-	0	0	23	-
IAL-73	M	39	-	-	-	-	0	0	22	-

Legenda: M: masculino; F: feminino; Ind.: indeterminado; (-): negativo; Ct: cycle threshold; Ct = 0 (indetectável); Alb: albumina; HTLV: HTLV positivo, mas não tipado.