

**KAROLINE RODRIGUES CAMPOS**

**Desafios no diagnóstico da infecção pelos Vírus  
Linfotrópicos de Células T Humanas do tipo 1 e tipo 2  
(HTLV-1 e HTLV-2) em pacientes infectados com o  
HIV-1.**

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:** Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

**SÃO PAULO**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Campos, Karoline Rodrigues.

Desafios no diagnóstico da infecção pelos Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas do tipo 1 e tipo 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em pacientes infectados com o HIV-1. / Karoline Rodrigues Campos. – 2016

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016. Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública. Orientação: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo.

1. Vírus 1 Linfotrópico T Humano. 2. Vírus 2 Linfotrópico T Humano. 3. Vírus 1 da Imunodeficiência Humana. 4. Coinfecção/complicações/diagnóstico. 5. Algoritmos. 6. Técnicas de Laboratório Clínico/métodos.

SES/CCD/CD-332/2016

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

**Apoio Financeiro**

**PPSUS-FAPESP # 2012/51220-8**

**DDAHV/SVS/MS-UNODC# 125/2013**

**Bolsa Mestrado CAPES**

*Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Generosa e  
à Profª Drª Adele Caterino de Araujo, exemplos a que busco me  
espelhar.*

## *Agradecimentos*

*A Deus pelo dom da vida, pela fé, oportunidade e por ter me capacitado para concretizar mais este sonho. Também por ter colocado anjos em meu caminho, sem a ajuda deles eu não teria conseguido.*

*Aos meus anjos:*

*Meus pais Francisco Rodrigues Campos Filho e Generosa Maria de Jesus Campos, que tanto admiro e amo, meus exemplos de coragem, amor e perseverança. São meus alicerces, sempre me encorajaram e me deram apoio incondicional para estudar e correr atrás deste sonho.*

*Minha querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adele Caterino de Araujo, pela paciência, dedicação e confiança que depositou em mim durante estes seis anos que tive a honra de desfrutar de sua convivência. Por todos os seus ensinamentos, pelo exemplo de profissional e de pessoa. Não há palavras para agradecer tudo o que tem me possibilitado. Saiba que tem minha eterna admiração. Posso dizer que é fonte de inspiração para todos aqueles que puderam enxergar o brilho em seus olhos reflexo do amor que tem dedicado a Pesquisa, a Docência e a Ciência.*

*À minha irmã Maryellen Rodrigues Campos pela minha sobrinha Maria Eduarda Campos, minha fonte de ternura e “abraços quentinhos”.*

*À Nadia Aparecida Costa pela amizade, apoio e por me ajudar na realização de alguns experimentos.*

*À Maria Gísele Gonçalves por auxiliar com os resultados de qPCR.*

*A todos os amigos e familiares que torceram por mim, seja de perto ou de longe, para que eu concluísse mais esta etapa de minha jornada, e por compreenderem minhas ausências.*

*Aos membros da Banca de Exame de Qualificação, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Moreira, Prof. Dr. José Eduardo Levi e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirthes Ueda, pelos apontamentos e sugestões, em especial às correções do português realizadas pela Prof<sup>a</sup> Ueda que enriqueceram este manuscrito.*

*Ao Instituto Adolfo Lutz e todos os lugares por onde passei ao Centro de Imunologia e ao Centro de Virologia - Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais. A todos aqueles que contribuíram para a minha formação e crescimento, não só profissional como pessoal.*

*Ao Programa de Pós Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretária de Estado da Saúde.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.*

*A todos os meus sinceros agradecimentos!*

**Campos, KR. Desafios no diagnóstico da infecção pelos Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas do tipo 1 e tipo 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em pacientes infectados com o HIV-1.**

**Resumo**

Desde a década de 90 o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL) tem realizado o diagnóstico da infecção por Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) e, desde então, têm sido reportadas as dificuldades principalmente no diagnóstico de HTLV-2, em especial em pacientes infectados pelo HIV-1. O presente trabalho teve como objetivo avaliar várias técnicas de diagnóstico disponíveis no momento atual (*kits* comerciais e testes *in house*) e estabelecer o melhor algoritmo para ser empregado no diagnóstico de pacientes infectados pelo HIV-1. A população analisada foi composta por dois grupos provenientes de Serviços de Assistência Especializados em HIV/AIDS de São Paulo: um pioneiro [Grupo 1 (G1), n=1.608] e outro com histórico mais recente [Grupo 2 (G2), n=1.383]. Ambos os grupos foram formados, na maioria, por indivíduos do sexo masculino [G1 (76,9%) e G2 (67,2%)] com média de idade de 44,3 (G1) e 35,6 (G2) anos. Os testes empregados na triagem sorológica das 2.991 amostras de sangue foram os ensaios imunoenzimáticos de 3ª geração (Murex e Gold ELISA); e aquelas com resultados reagentes foram subsequentemente avaliadas pelos testes sorológicos confirmatórios de Western Blot (WB) e INNO-Lia (LIA), e pelos ensaios moleculares de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR - *pol*) e *nested*-PCR-RFLP (*tax*). Foram consideradas HTLV-1/-2 positivas as amostras que

apresentaram reagentes em qualquer um dos quatro testes confirmatórios, e foram detectadas prevalências de 3,1% e 4,2% de infecção por HTLV-1/2, respectivamente, nos G1 e G2. Houve diferença em relação ao sexo (G2) e à idade entre as populações mono e coinfectadas por HIV-1/HTLV-1/2. Entre os coinfectados, 47,0% (G1) e 51,7% (G2) eram do sexo feminino e a média de idade foi maior no G1 (49,5 versus 43,5 anos). Na triagem sorológica 127 amostras foram reagentes, sendo que a infecção por HTLV foi comprovada em 108 amostras: 56 HTLV-1 [G1 (27) + G2 (29)], 45 HTLV-2 [G1 (21) + G2 (24)], uma dupla infecção HTLV-1 + HTLV-2 (G2) e seis HTLV [G1 (2) + G2 (4)]. As demais 19 amostras reagentes na triagem, nove permaneceram indeterminadas (G2) e 10 resultaram negativas [G1 (1), G2 (9)]. O ensaio confirmatório que apresentou maior sensibilidade, ao analisar esta população de indivíduos, foi o LIA (97,2%). Uma vez que nenhum teste confirmatório foi capaz de detectar 100% das amostras positivas para HTLV-1/2 em indivíduos infectados por HIV-1, faz-se necessário o uso de combinação de testes. O algoritmo de melhor custo-benefício para esta população seria a combinação da qPCR como teste de primeira escolha, seguido do LIA na avaliação de amostras negativas.

**Palavras Chave:** Vírus 1 linfotrópico T humano (HTLV-1); Vírus 2 linfotrópico T humano (HTLV-2); Vírus 1 da Imunodeficiência Humana (HIV-1); Coinfecção; Algoritmo; Técnicas de Laboratório Clínico.

**Campos, KR. Challenges in diagnosing the Human T-Cell Lymphotropic Virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with HIV-1.**

**Abstract**

Since the 90 decade, the Instituto Adolfo Lutz (IAL) has performed the diagnosis of Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2), and thenceforth the difficulties in diagnosing HTLV-2 have been reported, mostly in HIV-infected patients. The present study aimed at evaluating the several diagnostic techniques currently available (commercial kits and in-house assays), and to establish the best algorithm to be employed for diagnosing HTLV-1/-2 in patients infected with HIV-1. The study population was composed by two patient groups attended at HIV/AIDS specialized services care in São Paulo: the pioneer one [Group 1 (G1), n=1,608], and the other with the most recent historical health setting [Group 2 (G2), n=1,383]. The majority of the both groups were composed by male patients [G1 (76.9%) and G2 (67.2%)], with average ages of 44.3 (G1) and 35.6 (G2) years old. The assays employed for HTLV-1/-2 screening in 2,991 blood samples were the 3rd generation enzyme immunoassays (Murex and Gold ELISA); and those reagent samples were subsequently confirmed by Western Blot (WB) and INNO-Lia (LIA), and by means of two molecular methodologies, real-time PCR (qPCR – *pol*) and nested-PCR-RFLP (*tax*). Samples were considered HTLV-1/-2 positive when they showed specific reactivity, at least in one of the four confirmatory assays used in this study. HTLV-1/-2 prevalence of 3.1% (G1) and 4.2% (G2) were detected.

Differences in sex (G2) and average age among the HIV-mono-infected individuals and the HIV/HTLV-co-infected patients were found. Among the co-infected patients, 47.0% (G1) and 51.7% (G2) were female, and the average age was higher in G1 (49.5 vs. 43.5 years old). By serological screening, 127 sera samples were reagent, and the truly HTLV infection was confirmed in 108 samples, being 56 HTLV-1 [G1 (27) + G2 (29)], 45 HTLV-2 [G1 (21) + G2 (24)], one HTLV-1 + HTLV-2 double infection (G2) and six HTLV [G1 (2) + G2 (4)]. Of 19 reactive blood samples at screening assay, nine remained indeterminate (G2), and ten were considered negative [G1 (1) + G2 (9)]. The confirmatory assays employed for analyzing the blood samples from the patients included in the present study with better sensitivity values was LIA (97.2%). The obtained results confirmed that none of the confirmatory tests showed 100% sensitivity in detecting HTLV-1/-2 in samples from HIV-infected patients; thus, the use of combined tests should be crucial. Accordingly, the best cost-effective algorithm to be applied for testing these patients should be by employing qPCR as the first choice, and followed by LIA to analyze the negative samples.

**Key-words:** Human T-Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1); Human T-Lymphotropic Virus 2 (HTLV-2); Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1), Coinfection; Algorithm; and Clinical Laboratory Techniques.

## Lista de abreviações, siglas e símbolos

<b>AIDS</b>	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ATL</b>	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> - Leucemia linfoma de células T do adulto
<b>CCD</b>	Coordenadoria de Controle de Doenças
<b>CCR5</b>	Receptor do tipo 5 de quimiocinas com domínio CC
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos
<b>CIA</b>	<i>Chemiluminescence immunoassay</i> – ensaio de imunoquimioluminescência
<b>CPV</b>	Carga proviral
<b>CRT- A</b>	Centro de Referência e Treinamento – AIDS
<b>CV</b>	Carga viral
<b>CO</b>	<i>Cut-off</i> - Ponto de corte de reação imunoenzimática que define a positividade ou negatividade da amostra analisada
<b>Cq</b>	Ciclo de quantificação
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiamino tetraacético
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Immune Assay</i> - Ensaio imunoenzimático
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FAM</b>	Fluoróforo6-carboxyfluorescein
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> - Centro de Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos
<b>G1</b>	Grupo 1
<b>G2</b>	Grupo 2
<b>HBV</b>	<i>Hepatitis B Virus</i> – Vírus da Hepatite B
<b>HBZ</b>	<i>HTLV-1 basic leucine zipper factor</i>
<b>HCV</b>	<i>Hepatitis C Virus</i> – Vírus da Hepatite C
<b>HERV-1</b>	<i>Human Endogenous Retrovirus type I</i> – Retrovírus Endógeno do tipo 1
<b>HGIP</b>	<i>HTLV-1 gag Indeterminate Pattern</i> – Padrão HTLV-1 <i>gag</i> Indeterminado
<b>HIV-1</b>	<i>Human immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
<b>HLA</b>	<i>Human leukocytes antigen</i> – antígeno leucocitário humano
<b>HTLV</b>	<i>Human T-cell lymphotropic virus</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas

<b>HTLV-1</b>	<i>Human T-cell lymphotropic virus type I</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1
<b>HTLV-2</b>	<i>Human T-cell lymphotropic virus type II</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>IC95%</b>	Intervalo de Confiança de 95%
<b>ID</b>	Identificação da amostra
<b>IFI</b>	Imunofluorescência indireta
<b>Ig (A, M, G)</b>	Imunoglobulina de classe A, M ou G
<b>LIA</b>	<i>Line Immunoassay</i> - Imunoensaio de linha
<b>Kit</b>	Conjunto de reagentes
<b>MS</b>	Ministério da Saúde - Brasil
<b>n</b>	Número de amostras
<b>n-PCR</b>	<i>nested</i> PCR
<b>NFQ</b>	<i>Non fluorescent quencher</i>
<b>OD</b>	<i>Odds ratio</i> – “relação de probabilidade”
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i> - Regiões abertas para leitura
<b>p-value</b>	Valor de p
<b>PA</b>	Teste de aglutinação de partículas
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBL</b>	<i>Peripheral blood leukocytes</i> - leucócitos do sangue periférico
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
<b>PCR-RFLP</b>	<i>PCR - Restriction Fragments Length Polymorphism</i> - Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição enzimática em produtos de PCR
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa (em tempo real)
<b>RIP</b>	Radioimunoprecipitação
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
<b>SAE</b>	Serviço de Assistência Especializado
<b>SES</b>	Secretaria de Estado da Saúde
<b>SINAM</b>	Sistema Nacional de Atendimento Médico
<b>SISCEL</b>	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
<b>STLV-1</b>	<i>Simian T-Cell Lymphotropic Virus type I</i> – Vírus Linfotrópico de células T Símiás
<b>TARV</b>	Terapia Antirretroviral
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
<b>TSP/HAM</b>	<i>Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-Associated Myelopathy</i> - Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1
<b>UDI</b>	Usuário de drogas injetáveis
<b>Vs</b>	Versus
<b>VZV</b>	<i>Varicella Zoster Virus</i> – Vírus Varicela-Zoster
<b>WB</b>	<i>Western blot</i>

## Lista de Quadros e Tabelas

- Tabela 1.** Prevalências de infecção por HTLV-1 e ou HTLV-2 em indivíduos HIV-1 em diferentes regiões do Brasil e no mundo. **31**
- Quadro 1.** Composição e características dos dois *kits* EIA utilizados (REM e Murex), segundo as informações contidas nas respectivas bulas. **51**
- Quadro 2.** *Primers* e sondas utilizados nas reações de PCR em tempo real (qPCR) e *nested*-PCR convencional (*n*-PCR). **56**
- Quadro 3.** Protocolos utilizados para as reações de PCR em tempo real (qPCR), *nested*-PCR convencional (*n*-PCR) e RFLP. **58**
- Tabela 2.** Valores da relação entre densidades ópticas e *cut off* (DO/CO) das amostras reagentes e *borderline* em um dos ensaios imunoenzimáticos empregados na triagem de HTLV-1/2 com o resultado final dos testes confirmatórios. **63**
- Tabela 3.** Valores de sensibilidade e especificidade relativas, indicativa do desempenho dos EIA aplicados a cada grupo e à população de coinfectados HIV-1 / HTLV-1/2. **64**
- Tabela 4.** Frequência de resultado final apresentado pelas amostras reagentes na triagem para detecção de anticorpos específicos para infecção por HTLV-1/2 em população coinfectada por HIV-1. **65**
- Tabela 5.** Resultados individuais e finais nos ensaios confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) das amostras

positivas para infecção por HTLV-1/2 em pacientes coinfectados por HIV-1.

**66**

**Tabela 6.** Perfis de resultados indeterminados nos ensaios confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) negativos apresentados pelas amostras reagentes na triagem de infecção por HTLV-1/2 em população coinfectada por HIV-1.

**68**

**Tabela 7.** Valores de sensibilidade e especificidade relativas apresentados pelos testes confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) aplicados em cada grupo e nos indivíduos coinfectados HIV-1 / HTLV-1/2.

**70**

**Tabela 8.** Valores de sensibilidade relativa para cada tipo viral (HTLV-1 e HTLV-2) apresentado pelos testes confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) aplicado em cada grupo e nos indivíduos coinfectados HIV-1 / HTLV-1/2.

**70**

**Tabela 9.** Arranjo de quatro possíveis testes confirmatórios para compor o melhor algoritmo com relação custo-benefício para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 em população coinfectada por HIV-1.

**72**

**Tabela 10.** Dados demográficos dos dois grupos que compreendem os indivíduos coinfectados por HIV-1.

**76**

**Tabela 11.** Prevalência da infecção por HTLV-1/2 nos dois grupos que compreendem os indivíduos coinfectados por HIV-1.

**78**

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Partícula viral de HTLV.	<b>21</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do genoma do HTLV.	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Ciclo de replicação do HTLV <i>in vivo</i> .	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Algoritmo de testes laboratoriais empregado pelo Instituto Adolfo Lutz (1998-2007) para detecção de anticorpos dirigidos ao HTLV-1/2.	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> 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.	<b>43</b>
<b>Figura 6.</b> Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2009, modificado para etapa única.	<b>44</b>
<b>Figura 7.</b> Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2010.	<b>45</b>
<b>Figura 8.</b> Perfil de bandas apresentado no ensaio de <i>Western blot</i> 2.4.	<b>52</b>
<b>Figura 9.</b> Representação da leitura de bandas apresentada no ensaio LIA e disposição dos peptídeos inseridos nas tiras de nylon.	<b>54</b>
<b>Figura 10.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de <i>n</i> -PCR ( <i>tax</i> ) antes e depois da restrição enzimática (RFLP).	<b>56</b>
<b>Figura 11.</b> Curvas de amplificação obtidas nas reações de qPCR ( <i>pol</i> ) de HTLV-1 e HTLV-2 e para o gene de referência (albumina).	<b>59</b>

**Figura 12.** Algoritmo de testes laboratoriais sorológicos e molecular para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos HIV-1 positivos, proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2016. **73**

**Figura 13.** Algoritmo de testes laboratoriais sorológicos para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos HIV-1 positivos, proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2016. **74**

**Figura 14.** Distribuição de indivíduos, segundo o sexo, pertencentes aos dois grupos infectados por HIV-1 (G1 e G2), e de acordo com os resultados positivos e negativos para infecção por HTLV-1/2. **75**

**Figura 15.** Frequência de idades distribuídas em intervalos de 10 anos e classificadas quanto à positividade para infecção por HTLV-1/2 entre os dois grupos de pacientes HIV-1 positivos. **77**

**Figura 16.** Resultados obtidos a partir da frequência de idade dos dois grupos de pacientes HIV-1 positivos e coinfectados com HTLV-1/2. Análise por meio de GraphPad Prism e o programa estatístico Mann-Whitney U. **78**

# **Índice**

**Resumo**

**Abstract**

## **1. Introdução**

<b>1.1. Histórico</b>	<b>20</b>
<b>1.2. Epidemiologia</b>	<b>23</b>
<b>1.3. Aspectos Clínicos</b>	<b>27</b>
<b>1.4. Diagnóstico</b>	<b>35</b>

## **2. Objetivos**

<b>2.1. Geral</b>	<b>46</b>
<b>2.2. Específicos</b>	<b>46</b>

## **3. Casuística e métodos**

<b>3.1. Casuística</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Métodos</b>	
<b>3.2.1. Preparo de amostras</b>	<b>49</b>
<b>3.2.2. Testes Sorológicos</b>	<b>49</b>
<b>3.2.3. Testes Moleculares</b>	<b>55</b>
<b>3.2.4. Análise de Dados</b>	<b>60</b>

<b>4. Resultados</b>	
<b>4.1. Desempenho dos testes de Triagem</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Desempenho dos testes Confirmatórios</b>	<b>65</b>
<b>4.3. Análise de Custo-Benefício dos Algoritmos</b>	<b>70</b>
<b>4.4. Características Demográficas dos Grupos</b>	<b>75</b>
<b>5. Discussão</b>	<b>79</b>
<b>6. Conclusões</b>	<b>97</b>
<b>7. Referências</b>	<b>98</b>
<b>8. Anexos</b>	
<b>8.1. Aprovação CEP – CRT</b>	
<b>8.2. Aprovação CEPAL</b>	
<b>8.3. Resultados de DO/CO obtidos com os <i>kits</i> Murex e REM nas amostras pacientes de coinfeção HIV/HTLV do Grupo 1</b>	
<b>8.4. Resultados de DO/CO obtidos com os <i>kits</i> Murex e REM nas amostras pacientes de coinfeção HIV/HTLV do Grupo 2</b>	

# 1. Introdução

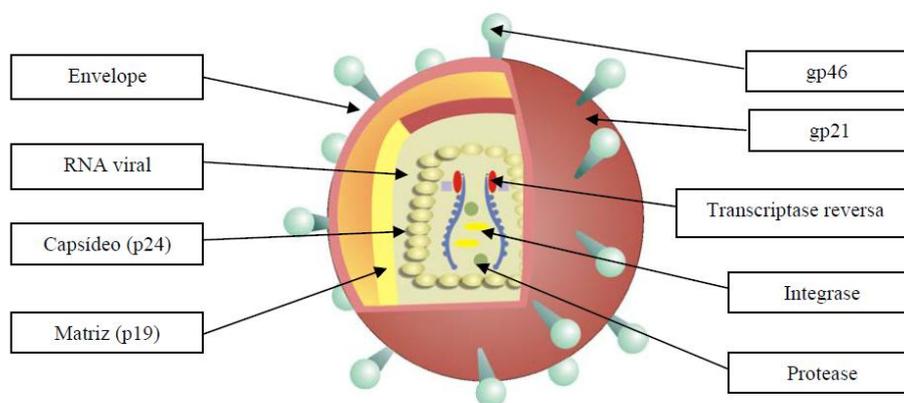
## 1.1. Histórico

Os vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1, isolado de linfócitos T de sangue periférico de paciente com linfoma cutâneo) e do tipo 2 (HTLV-2, isolado de baço de paciente com tricoleucemia de células T), foram descritos pela primeira vez no início da década de 80 (Poiesz et al., 1980 e Kalyanaraman et al., 1982, respectivamente). Estes vírus foram incluídos à família *Retroviridae* e subfamília *Oncovirinae* por apresentarem a enzima transcriptase reversa (produzida pelo gene *pol*) que transforma seu material genético RNA em DNA, quando dentro da célula hospedeira, e por serem os únicos vírus diplóides e de polaridade positiva (Tamegão-Lopes et al., 2006). Estes vírus têm tropismo por linfócitos T (HTLV-1 por linfócitos T CD4+e HTLV-2 por linfócitos T CD8+) (Bangham et al., 2014; Melamed et al., 2014).

### 1.1.2. Morfologia e Estrutura

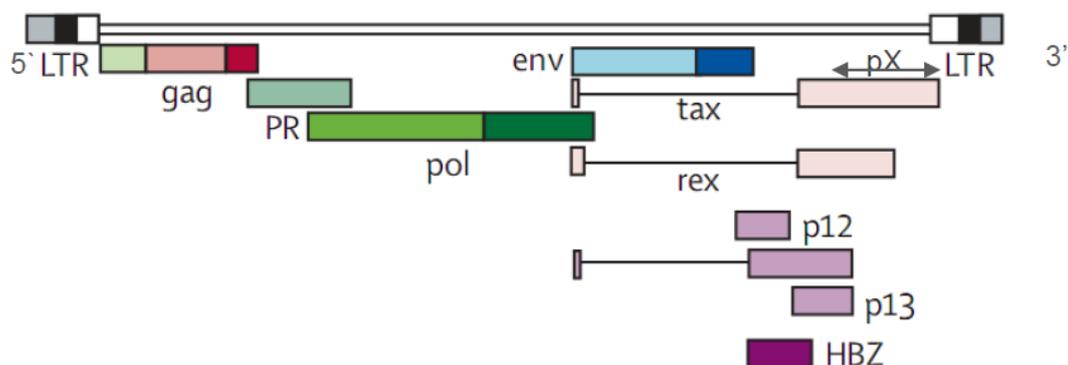
A partícula viral é esférica com 100 nm de diâmetro, e sua porção central (*core*) é composta pelo nucleocapsídeo que contém duas cópias de RNA simples de polaridade positiva (cada uma com aproximadamente 9 Kb) associada a uma molécula de RNAt (iniciador da síntese de DNA). O vírus possui a enzima transcriptase reversa e proteínas da matriz. Seu envelope é formado parcialmente pela membrana da célula hospedeira e por

glicoproteínas transmembrana e de superfície viral (Schüpbach e Kalyanaraman, 1989 e Catalan-Soares et al., 2005).



**Figura 1.** Partícula viral de HTLV. **Fonte:** Adaptado de Bezerra (1998).

Os genomas dos HTLV-1 e HTLV-2 apresentam similaridade de 65,0%, o que gera proteínas semelhantes e reações cruzadas nos testes sorológicos. Eles são diferenciados principalmente pela análise da região *pX* que compreende os genes *tax* e *rex* (Costa, 2004; Santos e Lima, 2005).



**Figura 2.** Representação esquemática do genoma do HTLV. **Fonte:** Adaptado de Verdonck et al.(2007).

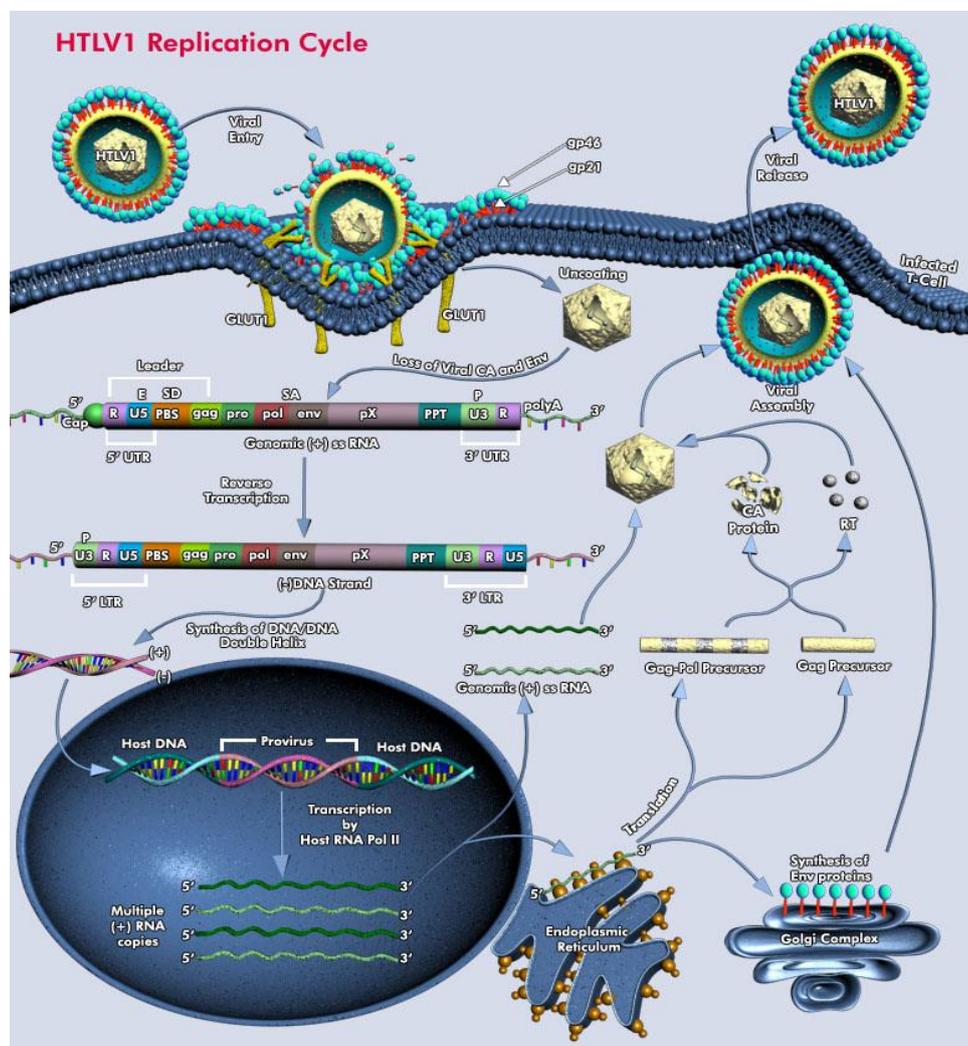
### 1.1.3. Integração e Replicação

Inicialmente, observa-se que a partícula viral se liga à superfície da célula hospedeira. Esta interação ocorre entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores específicos (receptor de transporte de glicose-1, neuropilina-1 e o proteoglicanas de heparan-sulfato utilizados apenas pelo HTLV-1) na superfície celular. Assim, o vírus consegue penetrar na célula e liberar seu material genético no citoplasma (Santos et al., 2005 e Jones et al., 2006). No citoplasma, a fita simples de RNA viral é transcrita para DNA e, nesta forma de DNA linear, migra para o núcleo da célula e se integra ao seu genoma; e pela ação da enzima integrase viral passa a ser denominado DNA proviral (Seiki et al., 1983).

Uma vez integrado, o provírus HTLV utiliza os mecanismos da célula hospedeira para realizar a transcrição primária do DNA proviral; depois, parte do RNA sintetizado gera RNA mensageiro que se traduz em proteínas virais no citoplasma. Na etapa final da replicação viral, ocorre a montagem do *core* viral, e a partícula viral é liberada da célula por um processo de brotamento, com incorporação de parte da membrana do hospedeiro ao envelope viral (Cann e Chen, 1996).

Sabe-se que os HTLV são pouco replicativos, e que a replicação viral *in vivo* ocorre mais pela expansão clonal das células infectadas, por meio da mitose do que pela da transcrição reversa (Brites et al., 2001; 2009). Pode, também, acontecer por sinapse celular, não se restringindo apenas à interações entre linfócitos, pois as células dendríticas podem carregar os

provírus (Pique e Jones., 2014). No entanto, recentemente atribuiu-se ao local de inserção do material genético viral no DNA da célula hospedeira como fator determinante para a replicação viral (Bangham, 2011).



**Figura 3.** Ciclo de replicação do HTLV *in vivo*. **Fonte:** Qiagen

## 1.2. Epidemiologia

No Japão, Caribe, África, América do Sul e ilhas da Melanésia o HTLV-1 é considerado endêmico. Em 2012 Geissan e Cassar estimaram prevalência de 5 a 10 milhões de portadores de HTLV com base apenas em

dados publicados. Há fortes indícios que estas informações estejam subestimadas, uma vez que esta infecção não faz parte da lista de doenças de notificação compulsória. Além disso, em 2002 a estimativa era de 15 a 20 milhões de pessoas infectadas, sendo 2,5 milhões no Brasil que aparece como o país com o maior número absoluto de infectados por HTLV, concentrados principalmente nas regiões Norte e Nordeste (Carneiro-Proietti et al., 2002; Marano et al., 2016).

O primeiro estudo de infecção por HTLV-1 no Brasil foi realizado em 1986 em imigrantes japoneses naturais de Okinawa, residentes na região de Campo Grande no Mato Grosso do Sul (Kitagawa et al., 1986).

Desde 1993, o Ministério da Saúde do Brasil tornou obrigatório a testagem sorológica de infecção por HTLV em bancos de sangue (Brasil, Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993). Não houve recomendação de uso de teste confirmatório e discriminatório. Assim, as taxas de prevalência em bancos de sangue algumas vezes se referem à infecção por HTLV-1/2.

A prevalência de doadores soropositivos em bancos de sangue na América do Sul varia de 0,08% a 1,8%. No Brasil os maiores índices se encontram nos estados do Pará, Amapá, Maranhão, Pernambuco e Bahia, e o estado com menor número de casos é Santa Catarina (Galvão-Castro et al., 1997; Catalan-Soares et al., 2005). No período de 2007 a 2009 a incidência de infecção por HTLV-1/2 em um Banco de Sangue de Minas Gerais foi de 3,59/100.000 (Carneiro-Proietti et al., 2012).

Para o HTLV-2, a maior prevalência é em populações indígenas da Amazônia, principalmente das tribos dos Kayapós, Munduruku, Tyrio, Arara do Laranjal e Kraho, seguida de usuários de drogas injetáveis (UDIs) e pacientes coinfectados pelo HIV-1 (Shindo et al., 2002; Morimoto, 2003; Santos e Lima, 2005).

A variabilidade geográfica da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 no Brasil pode estar relacionada a diferentes fatores:

Região Norte: ancestrais indígenas vindos da Ásia há 13.000 anos;

Região Nordeste e parte da Sudeste: descendentes de escravos africanos frutos do tráfico negreiro nos séculos XVI a XVIII;

Região Sudeste (principalmente São Paulo): imigração japonesa no século XX (Vallinoto et al., 2006).

### **1.2.1. Subtipos**

Análises de polimorfismos de fragmentos de restrição enzimática permitiram, já há alguns anos, conhecer a variabilidade genética entre alguns subtipos virais de HTLV. Mesmo com poucas variações, foi possível identificar diferentes tipos e classificá-los de acordo com o local de origem dos infectados. Essa baixa variabilidade genética, diferentemente do HIV-1, mostra adaptação dos HTLV à célula hospedeira. Entre os isolados de HTLV-1, os do Japão, leste da Índia, Américas e da África apresentam homologia de 97,0%, e o isolado mais distante proveniente da Melanésia

apresenta homologia de 92,0% quando comparado ao protótipo do Japão [(ATK) Seike et al., 1983].

Atualmente, para a caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2 e de seus subtipos virais, recorre-se ao sequenciamento e análise filogenética das regiões LTR e *env* dos genomas provirais, pois são as de maior variabilidade e preferidas para a genotipagem (Santos e Lima, 2005).

Estudos com as regiões LTR e *env* de HTLV-1 mostraram a existência de seis subtipos virais: HTLV-1a [Cosmopolita (C)], HTLV-1b [África Central (WA)], HTLV-1c [Melanésia/Austrália (M)], HTLV-1d [Pigmeu de Camarões na África Central], HTLV-1e [Pigmeu Efe residente no Zaire] e HTLV-1f [Gabon] (Lewis et al., 2000).

Quando analisadas as divergências entre as sequências nucleotídicas das regiões *gag*, *env* e LTR de HTLV-2 foram identificados quatro subtipos virais (Magri et al., 2013): HTLV-2a [predominante em UDIs (EUA/Europa)], HTLV-2b [predominante em indígenas do Panamá], HTLV-2c [predominante no Brasil] e HTLV-2d [presente em pigmeus na África].

As vias de transmissão mais comuns de HTLV-1 e HTLV-2 são: vertical (principalmente durante o aleitamento materno) e horizontal (sexual, sendo mais efetiva a transmissão de homem para mulher) (Figueiró-Filho, 2005; Caterino-de-Araujo et al., 2006). Pode também ocorrer contaminação parenteral, por meio de tratamento com hemoderivados, compartilhamento de agulhas/seringas por UDI (frequente entre portadores de HTLV-2); pelo canal do parto; acidentes com instrumentos perfuro-cortantes; contato com

sangue contaminado (Alcântara et al., 2003; Roucoux e Murphy., 2004; Proietti., 2006, Caterino-de-Araujo et al., 2010).

Os Bancos de Sangue de países onde o HTLV não é endêmico realizam a triagem sorológica para infecção pelos vírus linfotrópicos de células T em amostra de sangue de indivíduos de primeira doação (Tynell et al., 1998). Desde 2002, o Reino Unido realiza a sorologia em *minipools* de 48 amostras das bolsas de sangue que entram para doação (Davidson et al., 2006), enquanto outros países como Finlândia e Noruega interromperam a realização de triagem após anos de ausência de amostras positivas (Lamperche et al., 2009). Estas práticas têm se tornado frequente em países não endêmicos, em função de estudos de vigilância de hemoderivados que tem aliado à transmissão parenteral não só pelo contato entre células brancas contendo provírus, mas também em função de carga proviral (CPV) e de número de células infectadas presentes nos componentes de hemoderivados (Marano et al., 2016). Recentemente, estimou-se que a carga leucocitária necessária para propiciar a transmissão seria de  $9 \times 10^4$  células infectadas. Desta forma, a redução de leucócitos, seguida de irradiação, parece ser uma boa estratégia para minimizar este risco (Valerius et al., 1981; Cèsaire et al., 2004; Picker., 2006, Sobata et al., 2015; Marano et al., 2016). Hewitt e colaboradores (2013) mostraram redução de 93,0% de transmissão por componentes hemoderivados com redução de leucócitos.

### **1.3. Aspectos Clínicos**

Os mecanismos pelos quais ocorre a passagem do estado de portador assintomático para doente de HTLV não estão bem estabelecidos até o momento. Porém, são descritas doenças graves associadas ao HTLV-1 embora com baixa frequência, sendo cerca de 5,0% de mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e 2,0 a 3,0% de leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (Caterino-de-Araujo, 2009b).

Embora as patologias usualmente associadas ao HTLV-1 sejam de origem neurológica (HAM/TSP) e hematológica (ATL), à medida que os estudos são realizados, pode-se chegar ao conceito de síndrome. De fato, recentemente foram atribuídos à infecção por HTLV-1 os quadros graves de dermatite infecciosa, bexiga neurogênica, infecções parasitárias, doenças reumáticas, entre outras (Oliveira, 2010; Carneiro-Proietti, 2010).

Em relação às pacientes com sintomas neurológicos já se sabe que seus níveis de carga proviral (CPV) são maiores do que em portadores assintomáticos e em pacientes com sintomas hematológicos. Por conseguinte, sugere-se que a CPV e a pesquisa de antígeno leucocitário humano (HLA) sejam consideradas como indicadores de evolução de quadro assintomático para sintomático (Carneiro-Proietti et al; 2002).

### **1.3.1. Coinfecção com HIV-1**

Em virtude de compartilhamento das mesmas vias de aquisição/transmissão viral, não é rara a coinfecção pelos retrovírus HIV-1 (vírus da imunodeficiência humana) e HTLV-1/2. A princípio, o HIV-1 foi

considerado HTLV do tipo 3 (HTLV-III) por apresentar semelhança estrutural; mais tarde descobriram que se tratava de um vírus da mesma família, entretanto de subfamília distinta *Lentiviridae*. (Caterino-de-Araujo, 1985; Morimoto, 2003; Brites et al., 2009).

Estudos revelam que a coinfeção HIV-1/HTLV pode interferir no desenvolvimento e instalação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), variando-se de acordo com o tipo viral.

Considerando-se que ambos HIV-1 e HTLV-1 apresentam tropismo por linfócitos T CD4+, a infecção conjunta destes vírus pode causar progressão rápida para AIDS pelo fato do HTLV-1 imortalizar a célula e aumentar o número de T CD4+; e conseqüentemente, induzir o aumento de replicação viral. Ao mesmo tempo, os valores de CD4+ elevados interferem no início do tratamento antirretroviral (TARV), pois pode levar à falsa ideia de controle da replicação viral e da doença AIDS (Brites et al., 2009).

Em pacientes com coinfeção HIV-1/HTLV-2 pode ocorrer redução da replicação do HIV-1 e progressão lenta para a síndrome, tornando-se um fator protetor. Esta proteção tem sido associada à produção de quimiocinas que se ligam ao CCR5 (co-receptor para o HIV), que impede sua penetração na célula hospedeira (Pilotti et al., 2007). Este tipo de coinfeção costuma ser frequente entre os UDI (Roucoux e Murphy, 2004; Bagheri et al., 2008).

As áreas endêmicas para ambos os vírus linfotrópicos apresentam frequências variáveis em todo o mundo, com a maior prevalência nas grandes áreas metropolitanas nas Américas, Europa e África, onde os

eventos de transmissão de HIV-1 e HTLV-1/2 ocorrem por meio de partilha de agulhas e seringas contaminadas e pelas atividades sexuais (Dezzutti e Lal, 1999 e Araujo et al., 2002; Beilke, 2012; Promier et al., 2013). Estas prevalências têm variado de acordo com: a população estudada, a categoria de exposição aos retrovírus humanos, a localização geográfica dos indivíduos testados e o período em que foi realizado o estudo (de-Araujo et al., 1994; Caterino-de-Araujo et al. 1998, 2006, 2010; Caterino-de-Araujo e Santos-Fortuna, 1999; Casseb et al. 1997, Morimoto et al. 2005, 2007; Jacob et al., 2007, 2008; Dhasmana e Taylor, 2014).

Os anos de experiência do IAL na realização do diagnóstico em indivíduos coinfectados por HIV-1/HTLV-1/2, mostraram diferentes percentuais de positividade para as coinfeções HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2. Em 1998, a prevalência era de 10,1% (4,0% para HTLV-1 e 6,1% para HTLV-2) em pacientes com HIV/AIDS do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. No ano de 2007 foi detectada a prevalência de 5,8%, sendo 3,3% para o HTLV-1 e 2,5% para o HTLV-2 em pacientes atendidos em Serviços de Assistência Especializada (SAE) de São Paulo. Algumas prevalências de coinfeção HIV-1/HTLV-1 e ou HIV-1/HTLV-2 estão apresentadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Prevalências de infecção por HTLV-1 e ou HTLV-2 em indivíduos com a infecção HIV-1 em diferentes regiões do Brasil e do mundo.

<b>Autor / Ano de Publicação</b>	<b>Local de Realização do Estudo</b>	<b>Tipo de Estudo</b>	<b>Indivíduos Testados</b>	<b>Resultados</b>
<b>Moreira; 1993</b>	BA, Brasil	Corte Transversal	88 HIV-1	<b>22,7% HTLV-1/2</b>
<b>De-Araujo; 1994</b>	São Paulo - SP, Brasil	Corte Transversal	471 HIV-1	<b>13,2% HTLV-1/2</b> 7,8% HTLV-1 5,4% HTLV-2
<b>Brites; 1997</b>	BA, Brasil	Corte Transversal	895 HIV-1	<b>16,3% HTLV-1/2</b>
<b>Caterino-de-Araujo; 1998</b>	São Paulo - SP, Brasil	Corte Transversal	358 HIV-1	<b>10,1% HTLV-1/2</b> 4,0% HTLV-1 6,1% HTLV-2
<b>Vallinoto; 1998</b>	Belém- PA, Brasil	Corte Transversal	149 HIV-1	<b>8,1% HTLV-1/2</b> 2,7% HTLV-1 4,7% HTLV-2 0,7% HTLV
<b>Etzel; 2001</b>	Santos - SP, Brasil	Corte Transversal	499 HIV-1	<b>13,4% HTLV-1/2</b> 6,0% HTLV-1 7,4% HTLV-2
<b>Zehender; 2002</b>	Milão, Italia	Prospectivo	1.154 HIV-1	<b>8,2% HTLV-2</b>
<b>Beilke; 2004</b>	Nova Orleans, Estados Unidos da América	Prospectivo	3.600 HIV-1	<b>5,9% HTLV-1/2</b> 1,7% HTLV-1 4,0% HTLV-2 0,2% HTLV-1+2
<b>Morimoto; 2005</b>	Londrina - PR, Brasil	Corte Transversal	758 HIV-1	<b>5,7% HTLV-1/2</b> 0,8% HTLV-1 4,9% HTLV-2
<b>Barcellos; 2006</b>	Porto Alegre - RG, Brasil	Corte Transversal	2.985 HIV-1	<b>2,4% HTLV-1/2</b> 1,4% HTLV-1 0,5% HTLV-2
<b>Jacob; 2007</b>	São Paulo - SP, Brasil	Corte Transversal	1.393 HIV-1	<b>5,8% HTLV-1/2</b> 3,3% HTLV-1 2,5% HTLV-2
<b>Rego; 2009</b>	BA, Brasil	Prospectivo	144 gestantes HIV-1	<b>3,5% HTLV-1/2</b> <b>2,7% HTLV-1</b> <b>0,7% HTLV-2</b>
<b>Travassos; 2012</b>	BA, Brasil	Corte Transversal	63 gestantes HIV-1	3,4% HTLV-1/2 (EIA)
<b>Oliveira; 2012</b>	PI, Brasil	Prospectivo	805 HIV-1	2,24% HTLV-1/2(EIA) 1,12% HTLV-1(PCR) 0,5% HTLV-2(PCR)
<b>Galleto; 2014</b>	Canoas - RGS, Brasil	Corte Transversal	508 HIV	5,0% HTLV-1/2(EIA) 1,89% HTLV-1(PCR) 1,03% HTLV-2(PCR)
<b>Nasir; 2015</b>	Gwagwalada, Nigéria	Corte Transversal	184 HIV-1	4,9% HTLV-1/2 (EIA) <b>6,5% HTLV-1 (PCR)</b>
<b>Caterino-de-Araujo; 2015</b>	São Paulo - SP, Brasil	Corte Transversal	1.608 HIV-1	<b>3,1% HTLV-1/2</b> 1,7% HTLV-1 1,3% HTLV-2 0,6% HTLV

### **1.3.2. Mecanismos de resposta à infecção**

Na infecção pelo HTLV-1, primeiramente formam-se os anticorpos dirigidos a antígenos de superfície viral (gp46 e gp21) e, posteriormente, ao *core* (p15, p19 e p24). A resposta celular tem como principal alvo a proteína Tax que age como cofator de transcrição; e é uma das principais responsáveis pela proliferação de clones infectados, pois interfere na apoptose (Satou e Matsuoka, 2010).

Os indivíduos imunocompetentes podem se tornar portadores assintomáticos, e dependendo da CPV e de seu *background* genético, podem desenvolver a doença. Há evolução para doença com o decorrer dos anos, principalmente em mulheres com mais de 40 anos, o que pode estar relacionado à soroconversão tardia, aos hormônios femininos ou até mesmo ao déficit imunológico (Carneiro-Proietti et al., 2002; Catalan-Soares et al., 2001).

A infecção por HTLV-2 apresenta baixa correlação com o desenvolvimento de doenças. No entanto, alguns estudos relatam manifestações neurológicas e doenças linfoproliferativas em pacientes com coinfeção HIV/HTLV-2, principalmente entre UDI (Posada-Vergara et al., 2006).

### **3.3. Doenças relacionadas**

Apesar de pouco conhecimento sobre a patogênese do HTLV-1, os estudos demonstraram associação com HAM/TSP (Gessain et al., 1985), ATL (Yoshida et al., 1982), além de outras doenças como artrites, uveítes,

alveolites, otites e dermatites (Carvalho, et al., 2006; Carneiro-Proietti et al., 2002).

O desenvolvimento da HAM/TSP está relacionado à proteína Tax, que quando está expressa ativa a resposta celular, principalmente por parte de linfócitos T CD8+ (citotóxicos), gerando-se processo inflamatório com produção de citocinas. Antigamente, acreditava-se que o processo inflamatório atingia apenas o neuroeixo; posteriormente, descobriu-se que este evento afetava as funções corticais superiores. Esta doença é caracterizada pelo acometimento e pela fraqueza crônica e progressiva dos membros inferiores e pelos distúrbios esfinterianos (Carneiro-Proietti et al., 2002).

Apesar de a proteína Tax promover transativação viral e transformação celular, sua ligação com o desenvolvimento da ATL não pode ser confirmada pela ausência de sua detecção em 60,0% dos pacientes com ATL. Por outro lado, a proteína HBZ originária do gene *HTLV-1 basic leucin zipper factor* é detectada em todas as células leucêmicas na ATL, portanto esta é considerada responsável pela ATL (Matsuoka e Green, 2009). O envolvimento da HBZ na patogênese da ATL vai desde a imortalização de linfócitos T à indução de câncer.

O enigma da inativação do gene *tax* tem sido explicado por três mecanismos: mutações no gene (*nonsense*, deleção, inserção), deleção da região 5' LTR que contém o promotor para a tradução desta proteína; ou metilação do DNA na região 5' LTR, tornando-se o promotor inativo. Como a

proteína Tax se refere a uma sequência genômica grande, as células que não expressam ou expressam esta proteína em baixa concentração, conseguem evadir da resposta do sistema imunológico, e induzem a imortalização e circulação de linfócitos T infectados (Matsuoka e Green, 2009).

Sabe-se que há maior incidência de ATL sobretudo após a terceira década de vida, principalmente entre os 40 e 60 anos. Pelo fato de apresentar sintomas comuns a outras doenças linfoproliferativas, este quadro só pode ser confirmado com a detecção de anticorpos anti-HTLV-1, presença de células malignas linfóides da linhagem T e comprovação da integração monoclonal do HTLV-1 proviral (Carneiro-Proietti et al., 2002).

As demais patologias associadas à infecção por HTLV-1 são pouco conhecidas. Sabe-se que uveítes podem acontecer em consequência de produção de citocinas por parte de linfócitos T CD4+ infectados, que desencadeiam resposta inflamatória e de acordo com a proporção destas linfocinas, podem ocorrer lesões na retina e na córnea. Quanto às dermatites, estas podem decorrer da imunossupressão causada pelo vírus. Isto sugere oportunismo por patógenos da própria microbiota, como no caso de eczema de couro cabeludo ocasionado por *Staphylococcus aureus* e de outros sinais dermatológicos comuns como eritrodermia, psoríase e dermatite seborréica. (Carneiro-Proietti et al., 2002).

As artrites têm sido relacionadas ao HTLV-1 em estudos que comprovam seu tropismo por linfócitos CD68 de linhagem macrófaga do

líquido sinovial. A infiltração destes macrófagos ou de linfócitos infectados pelo vírus induz a produção de TNF $\alpha$  e aumenta a proliferação sinovial e, conseqüentemente, leva ao quadro de artrite (Carvalho et al., 2006). Recentemente foi demonstrada associação entre artrite e alta CPV de HTLV-1 em paciente de Moçambique (Caterino-de-Araujo et al., 2011).

Apesar da história natural da infecção por HTLV-1 não estar ainda totalmente esclarecida, Satou e Matsuoka (2010) associam a HAM/TSP e a ATL a determinados perfis genéticos do hospedeiro, e isto pode ocorrer nas outras doenças associadas ao HTLV-1.

#### **1.4. Diagnóstico**

O diagnóstico da infecção pelos HTLV-1/2 no Brasil tornou-se obrigatório em bancos de sangue no ano de 1993. O diagnóstico é realizado por triagem sorológica de amostras de plasma ou de soro, para pesquisa de anticorpos específicos anti-HTLV-1/2, podendo ser teste imunoenzimático (EIA) ou de quimioluminescência (CIA). As amostras reagentes são testadas novamente no mesmo ensaio em duplicata. Se as amostras persistirem reagentes ou forem inconclusivas, as respectivas bolsas de sangue devem ser excluídas da doação. Os doadores de sangue cujas amostras resultarem sororreagentes ou indeterminadas na triagem devem ser encaminhadas para os Ambulatórios de Especialidade do SUS para confirmação do diagnóstico (Ministério da Saúde, 1998; Costa et al., 2009).

Outro algoritmo foi sugerido aos Laboratórios de Saúde Pública, em

que é feito o mesmo esquema de triagem, e os soros positivos são submetidos aos testes confirmatórios de *Western Blot* (WB) seguido de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Brasil, Ministério da Saúde; 2003).

Os testes de triagem sorológica sofreram diversas adaptações ao longo dos anos. O primeiro *kit* EIA para pesquisa de anticorpos dirigidos ao HTLV-1/2 foi aprovado em 1988 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos da América. Os EIA de 1ª geração utilizavam lisado viral total de HTLV-1 como antígeno, e eram usados para a detecção de HTLV-1 e HTLV-2 em razão de semelhanças entre os dois tipos virais. Posteriormente, nesta mesma geração de testes, foi acrescentado o antígeno de lisado viral de HTLV-2 para aumentar a sensibilidade (Roucoux e Murphy, 2004; Morimoto, 2003). Aos testes de 2ª geração foram adicionadas proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos de HTLV-1 e HTLV-2, proporcionando-se maior sensibilidade ao método (Wiktor et al., 1991; Kline et al., 1994; Morimoto, 2003). Recentemente foram desenvolvidos os EIA de 3ª geração no formato sanduíche. Nesta técnica, tanto a fase sólida (adsorvida na placa) como o conjugado são compostos por proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos, tornando-a mais sensível e específica. No entanto, mesmo com estas adaptações há ainda falhas no diagnóstico principalmente de infecção por HTLV-2, e em pacientes com HIV/AIDS (Berini et al., 2008; Caterino-de-Araujo 2009b; Verdonck et al., 2009, Costa et al., 2011, Caterino-de-Araujo et al., 2015, Campos et al., 2015). A sensibilidade e especificidade dos testes estão associadas a configuração, antígeno empregado, classe de anticorpos detectada (IgA, IgM

e IgG) e população de estudo (baixa ou alta prevalência).

Dentre os métodos sorológicos padronizados como confirmatórios, a imunofluorescência indireta (IFI) foi pouco utilizada por falta de *kits* disponíveis no mercado, a rádio-imunoprecipitação (RIP) caiu em desuso por conta da utilização de compostos radiativos, e o WB tem sido usualmente empregado na rotina diagnóstica. Neste ensaio, os antígenos (lisado viral de HTLV-1 mais proteínas recombinantes do envelope de HTLV-1 e HTLV-2), previamente inseridos nas tiras de nitrocelulose, reagem com os anticorpos presentes no soro/plasma. Caso ocorra formação do complexo antígeno-anticorpo, este é revelado pelo acréscimo de solução contendo anti-IgG humana marcada com uma enzima e, posteriormente, se adiciona um cromógeno que reage com a enzima. Há formação de precipitado colorido em forma de bandas, de acordo com a presença de anticorpos específicos produzidos contra os respectivos antígenos de diferentes pesos moleculares (Jacob, 2007).

Da mesma forma como aconteceu com os EIA, os *kits* de WB também sofreram modificações no decorrer dos anos, principalmente os fabricados pela DBL (Diagnostics Biotechnology Laboratory, posteriormente Genelabs® Diagnosis, Abbott e mais recentemente MP Biomedicals). Neles foram incorporadas glicoproteínas recombinantes do envelope do HTLV-1 e HTLV-2 (MTA-1/rgp46-I e K-55/rgp46-II), bem como a proteína recombinante transmembrana GD21 comum para HTLV-1/2, para aumentar a sensibilidade e a especificidade, e para efetuar a diferenciação entre os dois tipos virais (Wiktor et al., 1991; Lipka et al., 1992; Varma et al., 1995; Poiesz et al.,

2000; Costa et al., 2013). Todavia, alguns estudos demonstraram que mesmo a última versão de WB 2.4, tem apresentado número relevante de soros com padrão indeterminado, variando-se de 0,5% em doadores de sangue (Césaire et al., 1999) a 7,0% em população de risco (Jacob et al., 2007). Estes resultados justificam a necessidade de verificar qual o melhor teste confirmatório a ser empregado para o diagnóstico discriminatório da infecção por HTLV, pois é de extrema importância para o direcionamento terapêutico (Mahieux et al., 2000).

Mais recentemente as PCR convencional, *nested* (n-PCR) e em tempo real (qPCR), que detectam segmentos do genoma proviral dos HTLV-1 e HTLV-2, passaram a ser usadas como testes confirmatórios para estas infecções (Vrieling et al., 1997; Estes e Sevall, 2003; Proietti, 2006; Tamegão-Lopes et al., 2006; Jacob et al., 2007b; Morimoto et al., 2007; Costa e Segurado, 2009, Andrade et al., 2010; Costa et al., 2011; Caterino-de-Araujo et al., 2015 e Campos et al., 2015).

As PCR são comumente realizadas com utilização do DNA extraído de células mononucleares/leucócitos do sangue periférico (*peripheral blood leukocytes* – PBLs), já que a replicação viral não produz viremia plasmática significativa. Desta forma, as amostras devem ser de sangue total coletadas em tubos contendo anticoagulante (Costa, 2010). Importante enfatizar que a PCR ainda não foi totalmente estabelecida como teste confirmatório. Portanto, esta reação é realizada preferencialmente na área de pesquisa em alguns laboratórios de referência, e necessita de padronização (protocolo único) para efetuar a comparação de sua eficiência em diferentes

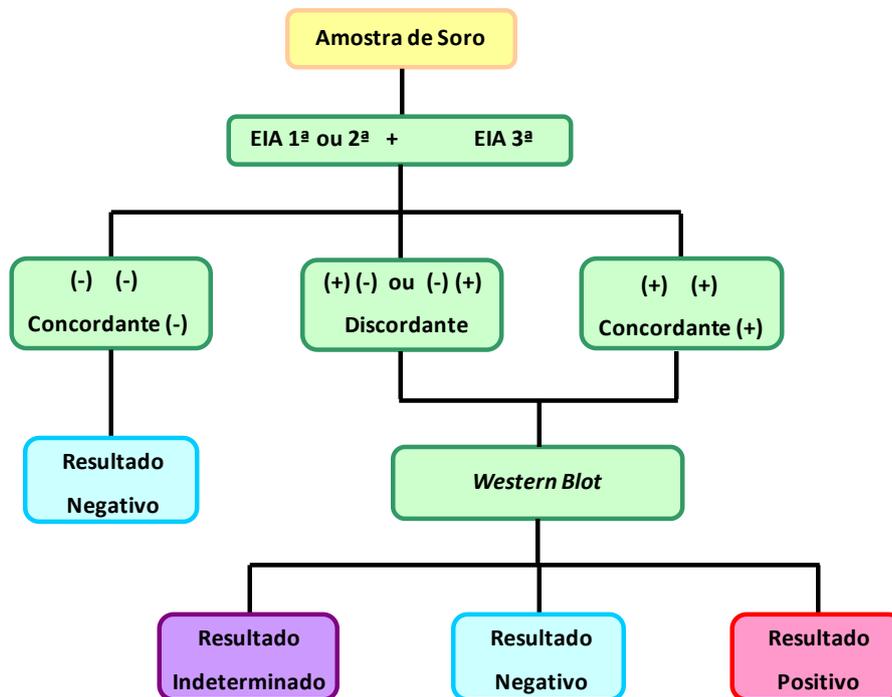
laboratórios. Não existem *kits* para detecção de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 disponíveis no comércio e com registro na ANVISA. Neste contexto, os estudos deverão ser desenvolvidos para padronizar as PCR realizadas “*in house*” no Brasil.

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo, desde dezembro de 1998 realiza a sorologia para HTLV-1/2 em amostras de sangue de indivíduos provenientes de Ambulatórios de Especialidades Médicas do Sistema Único de Saúde (AE-SUS), de SAE, do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS (CRT-A) e de Unidades Hemoterápicas do Estado, e desde então têm sido relatadas as dificuldades no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2 (De-Araujo et al., 1994; 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 diferia do recomendado pelo Ministério da Saúde (MS) [triagem sorológica realizada por um único EIA seguido pelo teste confirmatório de IFI e do WB] (Brasil, Ministério da Saúde; 1998). No IAL a triagem era realizada por dois EIA de gerações e composição antigênicas diferentes e pelo teste confirmatório de WB (**Figura 4**). Esta medida foi tomada porque nenhum dos *kits* EIA disponíveis no mercado (seja de 1ª, 2ª, ou 3ª geração) conseguia detectar todas as amostras verdadeiramente positivas para HTLV-1/2. (Campos et al., 2011)

Mesmo com as adaptações dos *kits* e a melhora na especificidade, 35,0% demonstraram perfis indeterminados no WB, em amostras

encaminhadas ao IAL até 2007(Jacob et al., 2008a). Quanto à especificidade e sensibilidade dos EIA, análises detalhadas destas amostras revelaram que os *kits* de 2ª geração foram mais específicos, e os de 3ª foram mais sensíveis (Jacob et al., 2007; Jacob et al., 2008a), porém a especificidade dos conjuntos de 3ª geração pôde ser melhorada alterando-se o valor do *cut-off* da reação de 1.0 para 2.1 (Jacob et al., 2009).



**Figura 4.** Algoritmo de testes laboratoriais empregado pelo Instituto Adolfo Lutz (1998-2007) para detecção de anticorpos dirigidos ao HTLV-1/2. **Fonte:** Adaptado de Jacob F. (2007).

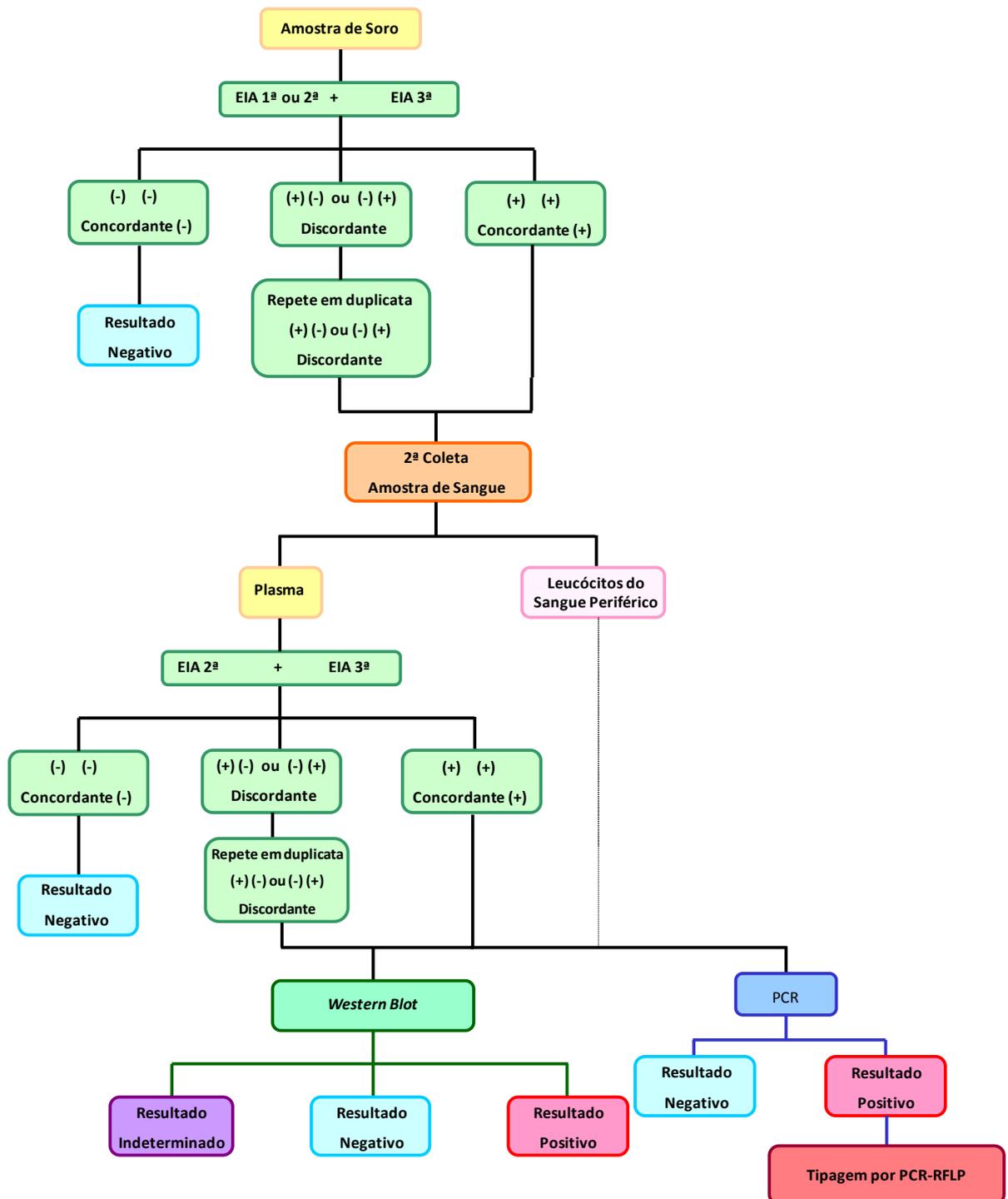
Diante das dificuldades para concluir o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 apontadas por Jacob F, um novo algoritmo foi implantado em 2007. A nova sequência diagnóstica tomou por base o algoritmo recomendado pelo MS para detecção de infecção por HIV, em que se solicita uma segunda amostra de sangue, quando a primeira resulta positiva

na triagem (Brasil, Ministério da Saúde; 2004). Desta forma, a primeira amostra de sangue coletado em tubo seco (soro) para a triagem (dois EIA), e em soros reagentes em pelo menos um deles, solicitava-se uma segunda amostra de sangue coletada em tubo com anticoagulante, para separação de células para realizar os testes moleculares, bem como o plasma para efetuar a repetição dos EIA e a confirmação por WB (**Figura 5**). A estratégia de coleta sequencial descartava resultados falsos positivos e negativos decorrentes de erros pré-analíticos, como também para comparar os resultados do WB com os da PCR, o que auxiliava nos casos de soroconversão (Costa, 2010).

As avaliações posteriores do algoritmo proposto em 2007 mostraram problemas. Os pacientes cujas amostras resultaram reagentes na triagem, não retornavam (quando seria coletada a segunda amostra de sangue total) para realizar os ensaios confirmatórios (Costa et al., 2009). Desta forma, o algoritmo foi abandonado, e foi implantado um de fase única em que se coletava sangue total com anticoagulante para ser usado na triagem e no confirmatório (**Figura 6**) (Costa; 2010).

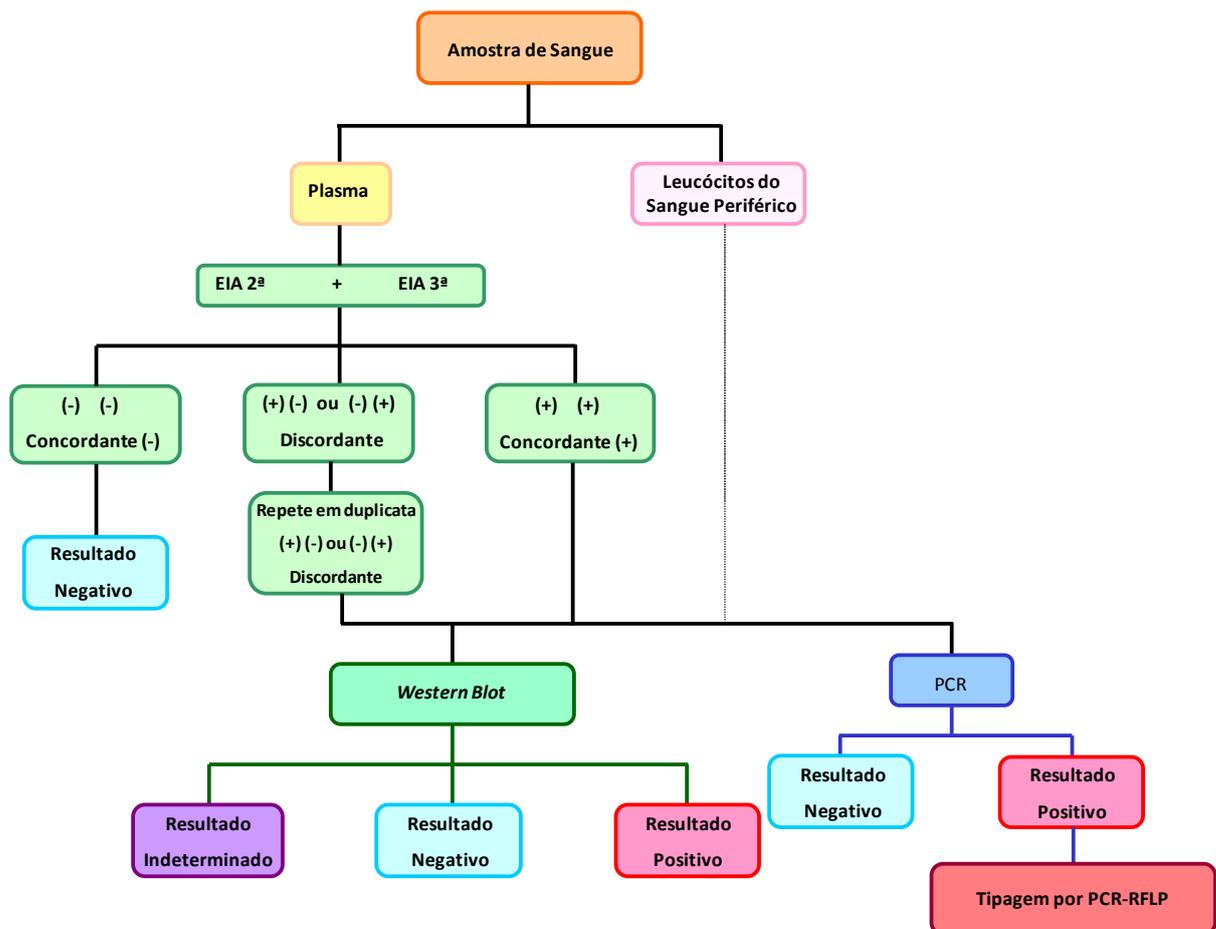
Mesmo com alteração do algoritmo para coleta de sangue em etapa única, algumas amostras foram coletadas incorretamente. Todas estas limitações foram apresentadas no estudo realizado por Costa em 2010, que comparou a eficiência do WB e de PCR-RFLP e PCR em tempo real em 73 amostras de sangue. Houve amostras com perfis indeterminados ou HTLV não tipado no WB que foram resolvidas pelas PCR. No entanto, o WB resultou positivo em amostras de pacientes com baixa CPV e coinfeção por

HIV-1 quando as PCR foram negativas, o que mostrou que os testes eram complementares. Uma importante análise foi quanto aos custos com os testes confirmatórios. Quando realizado primeiramente a qPCR e o WB nas amostras negativas (**Figura 7**), houve economia de 44,0% nos custos, considerando-se que a Instituição já tinha estrutura necessária para realizar os testes moleculares (Costa, 2010; Costa et al., 2010).



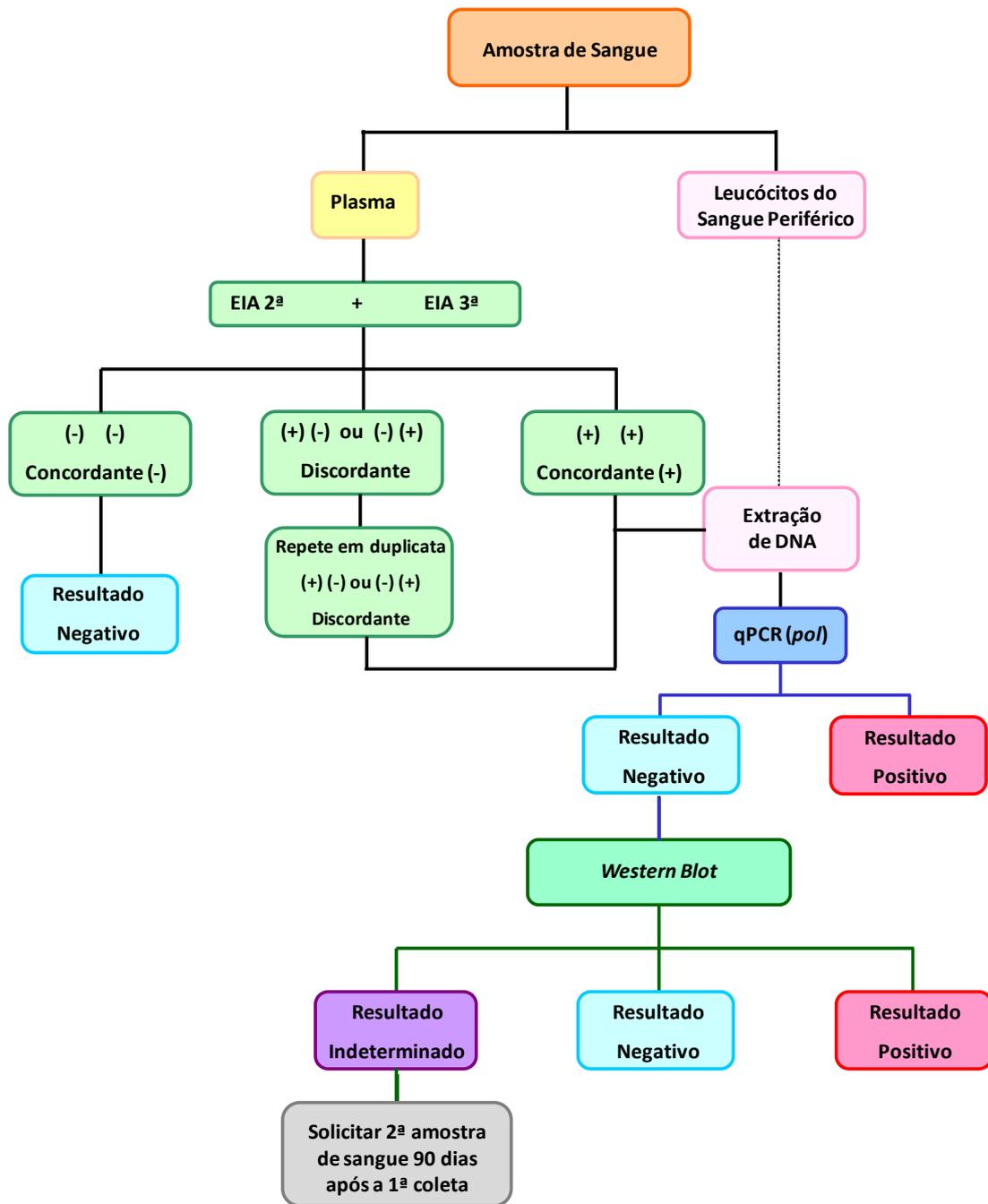
**Figura 5.** Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2007. **Fonte:** Adaptado de Jacob. (2007).

**Legenda:** (+): soro reagente; (-): soro não reagente; EIA: ensaio imunoenzimático; EIA 2ª: EIA de segunda geração; EIA 3ª: EIA de terceira geração; (Jacob F; 2007).



**Figura 6.** Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2009, modificado para etapa única. **Fonte:** Adaptado de Costa. (2010).

Diante do histórico de dificuldades apresentado, este estudo propõe avaliar a ocorrência dos problemas no diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população infectada pelo HIV-1, determinar o melhor algoritmo de testes laboratoriais a ser adotado e, conseqüentemente conhecer a prevalência atual de coinfeção HIV-1/HTLV-1/2 em SAE de São Paulo.



**Figura 7.** Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2010. **Fonte:** Adaptado de Costa. (2010).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Determinar o melhor algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 a ser adotado na coinfeção por HIV-1.

### **2.2. Objetivos específicos**

Comparar dois *kits* imunoenzimáticos para analisar o desempenho na triagem da infecção por HTLV-1/2, em relação à sensibilidade e especificidade dos testes quando aplicados na população infectada por HIV.

Analisar o desempenho de dois testes de detecção de anticorpos específicos (*Western Blot* e INNO-Lia) e dois de detecção de DNA proviral (qPCR e PCR-RFLP), e verificar o ensaio de melhor eficácia como confirmatório e discriminatório da infecção por HTLV-1 e HTLV-2, na população estudada.

Comparar diferentes combinações de testes confirmatórios quanto ao custo, facilidade de execução e benefício, com vistas a propor o melhor algoritmo para ser empregado em população infectada por HIV-1.

Determinar a prevalência atual da coinfeção HIV-1/HTLV em dois modelos de Serviços de Assistência Especializada a pacientes que vivem com HIV/AIDS de São Paulo.

### **3. Casuística e Métodos**

#### **3.1. Casuística**

A população estudada foi composta por dois grupos de indivíduos infectados por HIV-1. Um com indivíduos atendidos em um serviço de referência em HIV/AIDS pioneiro em São Paulo [**Grupo 1 (G1)**] e, o outro em centros com histórico de assistência mais recente [**Grupo 2 (G2)**]. Juntos totalizaram 2.991 amostras, cujo sangue foi coletado em tubo contendo EDTA para a separação de plasma e células, e de alguns pacientes em tubo seco (cinco amostras), que foram encaminhados ao IAL para realizar a pesquisa de infecção por HTLV-1/2 no período de 2012 a 2015.

Foram incluídas neste estudo as amostras de pacientes com infecção por HIV-1 confirmada segundo critérios do Ministério da Saúde, maiores de 18 anos, e que realizavam acompanhamento regular em um dos SAE de São Paulo que encaminhavam amostras para o IAL de São Paulo.

#### **Grupo 1**

Composto por 1.608 amostras de sangue obtidas de pacientes atendidos no Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CRT-A) de São Paulo, que aceitaram participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) e preencheram questionário, sendo 1.237 homens e 371 mulheres, faixa etária

de 19 a 83 anos (média de 44,3 anos). No questionário houve coleta de dados sócio-demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e, quando necessário, foram obtidos dados complementares contidos no prontuário do paciente. As amostras foram coletadas no período de agosto de 2013 a maio de 2014 e armazenadas em *freezer* a  $-20^{\circ}$  C.

## **Grupo 2**

Formado por 1.383 amostras de sangue provenientes de pacientes de SAE espalhados pela Grande São Paulo e ABC Paulista, sendo 930 homens e 453 mulheres, faixa etária de 18 a 84 anos (média de 35,6 anos) que foram encaminhados ao IAL Central para a rotina diagnóstica de infecção por HTLV-1/2 no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2015, que estavam estocadas em *freezer*  $-20^{\circ}$  C sob a guarda de Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adele Caterino de Araujo.

## **Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê Científico e Diretoria Geral do IAL (CTC # 106D/2013) e pelos Comitês de Ética das Instituições envolvidas, CEPIAL parecer 187.709, e CEP CRT, parecer 201.697 (**Anexos 8.1 e 8.2**).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Preparo das amostras**

As amostras de sangue total coletadas em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), após sedimentação espontânea, foram separadas em plasma e em leucócitos do sangue periférico (PBL – *Peripheral Blood Leukocytes*) depois de choque hipotônico; e as amostras foram armazenadas em *freezer* a -20°C. As amostras de sangue coletadas em tubo seco (n=5) tiveram o soro aliquotado e também foram armazenadas em *freezer* a -20°C.

### **Extração de DNA**

As amostras reagentes em pelo menos um dos testes de triagem sorológica, tiveram o DNA extraído a partir do PBL, usando-se o sistema robotizado da Roche (Extrator MagNA Pure LC 2.0) e o *kit* MagNA Pure LC DNA isolation *kit* I, Roche Diagnostics GmbH – Roche Applied Science-Mannheim, Germany, conforme orientação do fabricante.

### **3.2.2. Testes Sorológicos**

#### **Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Immunoassay* - EIA)**

A triagem diagnóstica da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 foi feita por meio de detecção de anticorpos específicos anti-HTLV-1/2 utilizando-se dois *kits* comerciais: Gold ELISA HTLV I+II(REM-SP, BR) e o Murex HTLV I+II (Diasorin, UK), ambos de 3ª geração, que empregam peptídeos sintéticos e/ou proteínas recombinantes como antígenos e conjugado.

Todos os ensaios seguiram as instruções recomendadas pelos fabricantes. Para o critério de reatividade positiva ou negativa foi seguido o procedimento adotado pelas respectivas firmas produtoras de ambos os reagentes. Para tanto o cálculo foi feito pelo valor do coeficiente da densidade óptica (DO) de cada amostra em relação ao valor do ponto de corte ou “*cut off*” (CO) da reação. O valor de CO foi estabelecido pela média de DO dos três controles negativos e somado ao valor constante (fator de correção) determinado pelo fabricante de cada *kit* (**Quadro 1**). Foi considerada reagente a amostra com relação cujo valor foi igual ou superior a um. As amostras com valores dentro da margem de até 20% abaixo do CO foram consideradas na zona cinza (*borderline*). Estas amostras foram analisadas pelos testes confirmatórios, seguindo-se o fluxograma.

**Quadro 1.** Composição e características dos dois *kits* EIA utilizados (REM e Murex), segundo as informações contidas nas respectivas bulas.

Fabricante	REM - Gold ELISA	DiaSorin - Murex
<b>Anticorpo Capturado</b>	IgG, IgM e IgA	IgG, IgM e IgA
<b>Fase Adsorvida</b>	peptídeos sintéticos e recombinantes de HTLV-1 + HTLV-2	peptídeos sintéticos e recombinantes de <i>env</i> gp46-I e gp46-II + rgp21 de HTLV-2
<b>Conjugado</b>	peptídeos sintéticos e recombinantes de HTLV-1 + HTLV-2 - <b>marcado com peroxidase</b>	peptídeos sintéticos e recombinantes de <i>env</i> gp46-I e gp46-II + rgp21 de HTLV-2 - <b>marcado com peroxidase</b>
<b>Substrato</b>	TBM - tetrametilbenzina	TBM - tetrametilbenzina
<b>Tampão de Lavagem</b>	Fosfato - Salina + 2% de 2-cloroacetamida	Glicina - Borato + 0,2% de 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane
<b>Solução de Parada</b>	HCl - 1M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - 0,5 a 2M
<b>Tempo de Incubação (minutos)</b>	75	90
<b>Cut off</b>	Média de CN + 0,250	Média de CN + 0,250
<b>Leitura (comprimento de onda)</b>	450nm com filtro de correção (620/630 nm)	450nm com filtro de correção (620/690 nm)
<b>Tipo de Amostra</b>	Soro ou plasma	Soro ou plasma
<b>Apresentação do Ensaio</b>	Placas de microtitulação em tiras	Placas de microtitulação em tiras
<b>Formato</b>	ELISA - Sanduíche (3ª Geração)	ELISA - Sanduíche (3ª Geração)
<b>Tipo de Ensaio</b>	Indireto	Indireto
<b>Sensibilidade</b>	100%	100%
<b>Especificidade</b>	99,97%	99,94%

**Legenda:** CN – Controle Negativo.

### **Western Blot (WB)**

O *kit* comercial HTLV Blot 2.4 (MP Biomedicals, Asia Pacific Pte. Ltd) consiste na detecção de anticorpos específicos para HTLV-1 e para HTLV-2, por meio de proteínas transferidas e peptídeos sintéticos inseridos em tiras

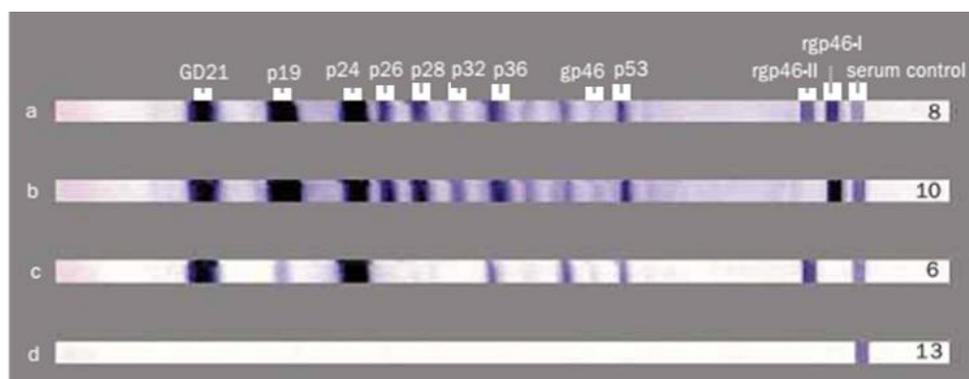
de nitrocelulose. Algumas bandas são características de infecção por um tipo viral, enquanto outras são de antígenos compartilhados. Seguindo-se os critérios de reatividade de bandas recomendados pelo fabricante, confirma-se a soropositividade para:

HTLV-1: reatividade para bandas correspondentes aos genes *gag* (p19 com ou sem p24) e *env* (GD21 e rgp46-I);

HTLV-2: reatividade para bandas dos genes *gag* (p24 com ou sem p19) e *env* (GD21 e rgp46-II);

HTLV não tipado: reatividade para bandas dos genes *gag* (p19 e p24) e *env* (GD21);

Indeterminado: reatividade para bandas específicas do HTLV, mas que não preenchem os critérios de positividade para o HTLV-1 ou HTLV-2, ou HTLV.



**Figura 8.** Perfil de bandas apresentado no ensaio de *Western blot* 2.4.

**Fonte:** Adaptado da Bula HTLV BLOT 2.4 MP Biomedicals.

**Legenda:** a (perfil representativo de infecção por HTLV-1 e HTLV-2), b (perfil representativo de infecção por HTLV-1), c (perfil representativo de infecção por HTLV-2).

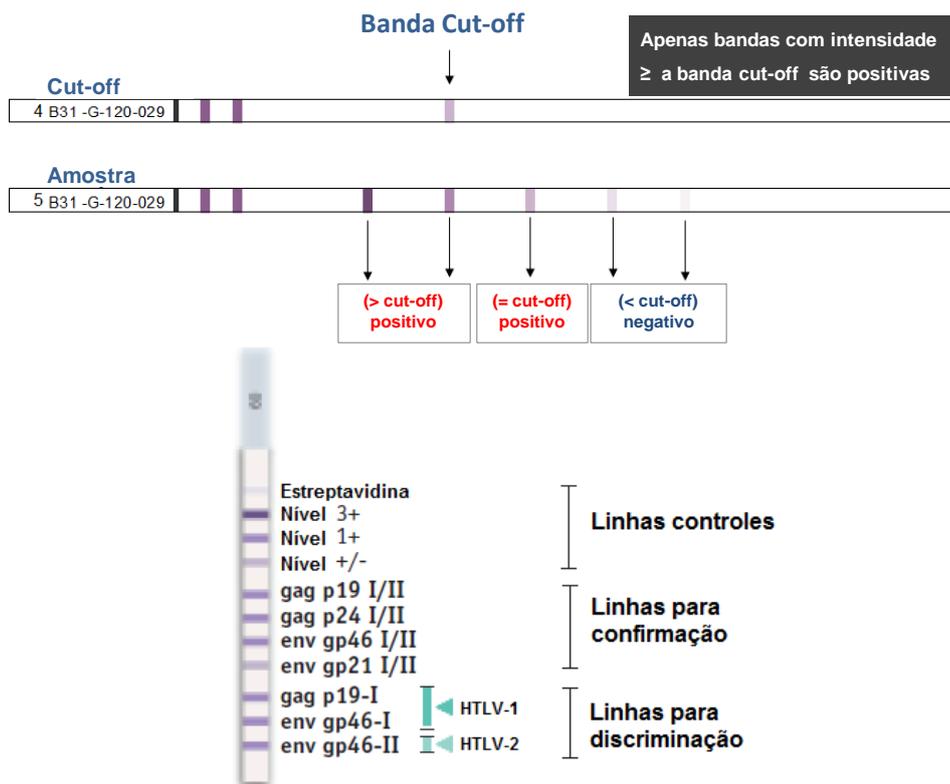
## **Imunoensaio de linha (*Line Immunoassay* – LIA)**

Este ensaio é baseado em peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes inseridos em tira de nylon, e o INNO-LIA HTLV I/II Score (Fujirebio, Europe N.V, Belgium) contém antígenos para validar, confirmar a infecção por HTLV e discriminar os dois tipos virais.

A validação do ensaio ocorre pela análise das três bandas na parte superior da tira; uma direcionada aos anticorpos humanos de todas as classes (+3) e controle de adição da amostra, e as outras duas bandas aos anticorpos da classe IgG (+1 e +/-). A intensidade de cor desta última banda é utilizada como ponto de corte para considerar a presença ou ausência das bandas confirmatórias e discriminatórias.

Segundo os critérios do fabricante é confirmada a infecção por HTLV quando há reatividade para duas ou mais bandas correspondentes ao gene *gag* (p19 I/II e p24 I/II) e *env* (gp46 I/II e gp21 I/II), sendo obrigatoriamente uma delas *env* gp21 I/II. Nos casos em que reage apenas com a gp21 I/II ou duas das outras três bandas, é considerado como perfil indeterminado.

Após confirmar a infecção por HTLV, analisa-se o perfil de bandas na parte inferior da tira. Comprova-se a infecção por HTLV-1 quando há presença de banda *gag* p19-I e *env* gp46-I, enquanto a infecção por HTLV-2 consiste na reatividade de *env* gp46-II ou nos casos em que aparecem as três bandas; e a somatória de intensidade de cor de *gag* p19-I e *env* gp46-I é menor do que a de *env* gp46-II.



**Figura 9.** Representação da leitura de bandas apresentadas no ensaio LIA e disposição dos peptídeos inseridos nas tiras de *nylon*. **Fonte:** Adaptado de Bergnan Diagnóstika e *Gold Standard Diagnostics*.

### 3.2.3. Testes Moleculares

#### ***Nested Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (n-PCR-RFLP)***

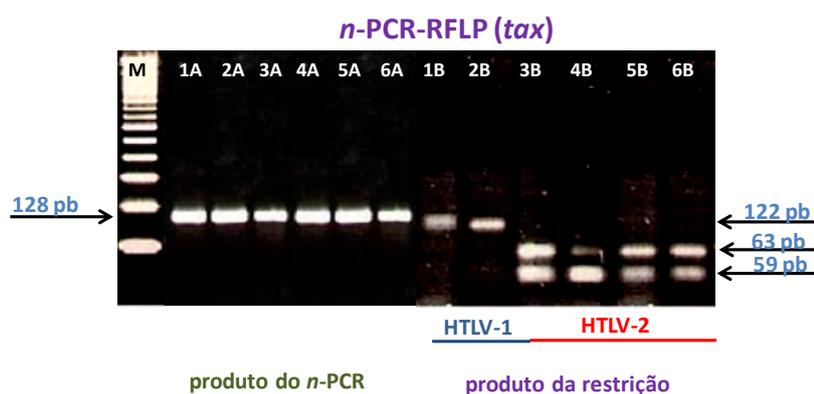
O ensaio de n-PCR amplifica um segmento de 128pb da região *tax* de HTLV-1/2 utilizando-se os *primers* descritos por Heneine et al., (1992) que amplifica o fragmento genômico de ambos os tipos virais (**Quadro 2**). Para realizar a discriminação de HTLV-1 e HTLV-2, foi pesquisado o sítio de restrição enzimática de *Taq I* (Tuke et al., 1992).

A interpretação da reação é feita observando-se o resultado obtido na eletroforese dos fragmentos originados da digestão de produto específico em gel de agarose a 4%. O *amplicon* de *tax* de HTLV-2 possui dois sítios de restrição, porém são observadas duas bandas (59 e 63pb), pois o fragmento de 6pb não é possível visualizar. Enquanto a *tax* de HTLV-1 possui apenas um sítio para ação da *Taq I*, um dos fragmentos digeridos corresponde ao tamanho de 6bp, e somente uma única banda de 122pb torna-se visível.

**Quadro 2.** *Primers* e sondas utilizados nas reações de PCR em tempo real (qPCR) e *nested*-PCR convencional (*n*-PCR).

Gene	Primers e sondas	Sequência (5' - 3')	N°(nt)	Localização no genoma(nt) <sup>a</sup>	Ensaio
<i>pol</i>	HTLV-1 F	GAA CGC TCT AAT GGC ATT CTT AAA ACC	27	4788-4814	q PCR
	HTLV-1 R	GTG GTT GAT TGT CCA TAG GGC TAT	24	4895-4872	
	HTLV-1*	FAM-ACA AAC CCG ACC TAC CC-NFQ	17	4837-4852	
	HTLV-2 F	CAA CCC CAC CAG CTC AGG	18	4740-4757	
	HTLV-2 R	GGG AAG GTT AGG ACA GTC TAG TAG ATA	27	4830-4803	
	HTLV-2*	FAM-TCG AGA GAA CCA ATG GTA TAA T-NFQ	22	4763-4784	
	Albumina F	GCT CAA CTC CCT ATT GCT ATC ACA	24	16222-16245	
	Albumina R	GGG CAT GAC AGG TTT TGC AAT ATT A	25	16351-16327	
	Albumina*	FAM-TTG TGG GCT GTA ATC AT-NFQ	17	16294-16310	
<i>tax</i>	SK 43	CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT	20	7359 - 7378	1ª round PCR
	SK 44	GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG	21	7517-7497	2ª round PCR
	TAX 1	GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA	20	7375-7394	
	TAX 2	CCA TCG ATG GGG TCC CA	17	7502-7486	

**Legenda:** nt: nucleotídeos (bases nitrogenadas); FAM: *fluorescent reporter dye*, 6-carboxy-fluorescein; NFQ: *non-fluorescent quencher*; *n*-PCR: *nested* PCR; <sup>a</sup> : 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 albumina humana (número de acesso em GenBank M12523).



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de *n*-PCR (*tax*) antes e depois da restrição enzimática (RFLP). **Fonte:** Adaptado de Caterino-de-Araujo.

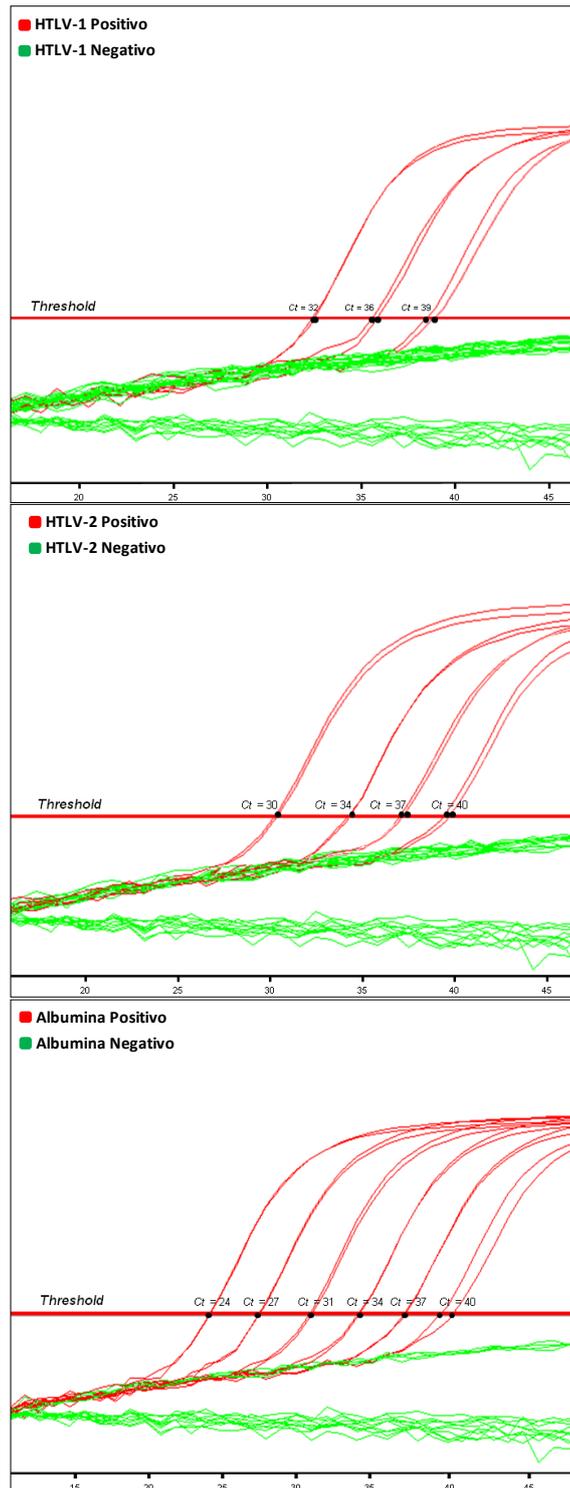
### **Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)**

Para efetuar a pesquisa de três sequências alvo para confirmar a infecção por HTLV-1/2 por meio da qPCR, utilizou-se o sistema Taq Man® (Applied Biosystems, USA) para detectar o gene da albumina humana como controle endógeno e os genes *pol* de HTLV-1 e HTLV-2. Os *primers*, as sondas e os protocolos de reação foram aqueles descritos por Costa et al.(2011) [**Quadros 2 e 3**] e adaptados por Gonçalves (2015) [dados não publicados], com base nas descrições de Dehée et al. (2002); Lee et al.(2004); Tamegão-Lopes et al.(2006) e Vitone et al.(2006). O *input* de DNA (5 µL) não foi baseado na dosagem de concentração de material genético, porém, a amplificação do gene da albumina foi utilizada como controle de reação (amplificação), e também como verificador de qualidade (presença) de DNA. Foram consideradas positivas as amostras de DNA que tiveram o ciclo de quantificação (Cq) de até 39 para HTLV-1 e 40 para HTLV-2. O limite de detecção da qPCR (*pol*) foi de 10 cópias de HTLV-1 e de HTLV-2.

**Quadro 3.** Protocolos utilizados para as reações de PCR em tempo real (qPCR), *nested*-PCR convencional (*n*-PCR) e RFLP.

Condições de reação	q PCR ( <i>pol</i> )	<i>n</i> -PCR ( <i>tax</i> )		RFLP
		1º round	2º round	
<b>Reagentes</b>				
<i>Master mix real time</i>	15 µL			
<i>Master mix Taq Colorless</i>		12,5 µl		
<i>Master mix Taq Green</i>			25 µl	
<i>Primer sense</i> (12,5 pmol/µL)	0,5 µL			
<i>Primer sense</i> (12,5 pmol/µL)		0,5 µl	1 µl	
<i>Primer anti-sense</i> (12,5 pmol/µL)	0,5 µL			
<i>Primer anti-sense</i> (12,5 pmol/µL)		0,5 µl	1 µl	
Sonda (12,5 pmol/µL)	0,5 µL			
H <sub>2</sub> O	8,5 µL	9 µl	18 µl	12,3 µl
Tampão (10X)				2 µL
BSA (10 µg/µL)				0,2 µL
<i>Taq I</i> (10 u/µL)				0,5 µl
DNA <i>input</i> *	5 µL	2,5 µL	5 µL	5 µL
Volume final	30 µL	25 µL	50 µL	20 µL
<b>Termociclagem</b>				
	50° C - 2'	94° C - 1'	45X	65° C - 5h 85° C - 30' 20° C - ∞
	95° C - 10"	94° C - 30"		
	90° C - 50"	55° C - 30"		
	60° C - 1'	72° C - 30"		
		72° C - 7' 8° C - ∞		
<b>Amplicon</b>				
HTLV-1	108 pb	159 pb	128 pb	122 + 6 pb
HTLV-2	91 pb			69 + 53 + 6 pb
Albumina	130 pb			

**Legenda:** Master Mix (Taq Man® Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA); Master Mix Taq Colorless (Mix GoTaq® Colorless Master, Promega), Master Mix Taq Green (Mix GoTaq® Green Master, Promega), *Taq I* + Tampão [Tris-HCl (10mM - pH 7.4), KCl (300 mM), EDTA (0.1mM), DTT (1mM), BSA (0.5mg/ml) glycerol (50%)] + BSA (Promega), pb: pares de bases nitrogenadas, \*(DNA não dosado).



**Figura 11.** Curvas de amplificação obtidas nas reações de qPCR (*poI*) de HTLV-1 e HTLV-2 e para o gene de referência (albumina). **Fonte:** Adaptado de Campos. (2010) e Costa. (2010).

### 3.2.4. Análise dos dados

Após a coleta das informações, foi constituído um banco de dados utilizando-se o programa Epi Info versão 3.5.4 para Windows. O teste de Qui-Quadrado (múltiplos grupos) ou exato de Fisher (dois grupos) e o Statcalc (*Odds ratio*) foram empregados na análise das variáveis categóricas.

As variáveis contínuas (densidade ótica nos ensaios imunoenzimáticos) foram avaliadas pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (múltiplos grupos) ou Mann-Whitney (dois grupos), e o programa estatístico GraphPad Prism 3.0 foi aplicado. Associações estatisticamente significantes foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ . Os gráficos de variáveis categóricas foram construídos a partir dos dados da planilha Excel e os de dispersão foram elaborados com auxílio do Programa GraphPad Prism®, versão 3.0.

A sensibilidade relativa e a especificidade relativa dos testes foram calculadas segundo Kawamura 2002, considerando-se o resultado final como verdadeiro positivo aquele obtido em pelo menos um dos testes confirmatórios, e não pela presença ou ausência de doença.

Para a avaliação de custo/efetividade dos testes confirmatórios foram considerados os valores de R\$ 210,00 para cada teste WB, R\$ 230,00 para cada teste LIA, R\$ 82,95 para a qPCR e R\$ 13,50 para a PCR-RFLP,

tomando-se como base a cotação de preços de julho de 2014 e a avaliação de diferentes algoritmos.

## 4. Resultados

### 4.1. Desempenho dos testes de triagem

Quando as 1.608 amostras do G1 foram analisadas no *kit* Gold ELISA REM (R), 49 resultaram reagentes, e pelo *kit* Murex (M) 51 apresentaram resultados positivos. No G2, das 1.383 amostras analisadas, 70 resultaram reagentes pelo *kit* R e 70 pelo *kit* M. Quatro amostras apresentaram DO na zona cinza, sendo uma no R (G1) e três no M (G2).

Uma análise mais detalhada dos valores de DO/CO obtidos nos EIA mostrou que as médias de absorbâncias apresentadas pelo R eram em geral mais baixas do que as do M, exceto no G1 para o HTLV-1. O *kit* R aparentou ser de menor sensibilidade, uma vez que uma amostra apresentou a relação DO/CO inconclusiva [ID42 (HTLV-2)] (Barreto-Damião et al. 2014; Campos et al., 2015). Em outras duas amostras os valores de DO/CO foram bem abaixo da zona cinza [ID67 (HTLV-1) e ID79 (HTLV)], e estas três amostras foram provenientes de pacientes que tiveram a infecção por HTLV confirmada (**Tabela 2**).

Quanto ao *kit* M, foi detectada uma amostra inconclusiva [ID79 (HTLV)] em que o respectivo paciente teve confirmação da infecção por HTLV pelo LIA. Cinco amostras com resultados na zona cinza ou abaixo dela [**Tabela 2** ID113, 114, 115, 117 e 127], tiveram perfil indeterminado ou foram negativas nos testes confirmatórios.

**Tabela 2.** Valores da relação entre densidades ópticas e *cut off* (DO/CO) das amostras reagentes ou *borderline* em um dos ensaios imunoenzimáticos empregados na triagem de HTLV-1/2 e o resultado final.

ID	Murex	REM	Resultado Final	ID	Murex	REM	Resultado Final	ID	Murex	REM	Resultado Final
1	10,5	7,1	HTLV-2	44	10,1	7,1	HTLV-2	87	9,9	9,8	HTLV-1
2	10,2	7	HTLV	45	8,6	4	HTLV-2	88	10,0	8,1	HTLV-1
3	9,8	10,1	HTLV-1	46	10,7	8,8	HTLV-1	89	8,0	2,0	HTLV-2
4	8,8	6,6	HTLV-1	47	7,6	3,5	HTLV-2	90	13,1	9,4	HTLV-2
5	7,2	9	HTLV-2	48	10,5	8,5	HTLV-2	91	13,2	8,8	HTLV-1
6	7,1	9,3	HTLV-1	49	10,7	8,6	HTLV-1	92	12,7	10,3	HTLV-1
7	2,8	3,1	HTLV-1	50	13,2	8	HTLV-2	93	12,1	4,9	HTLV-2
8	5,7	2,8	HTLV-2	51	12,8	8,5	HTLV-1	94	12,6	3,0	HTLV-2
9	8,5	8,5	HTLV-1	52	13,1	9,5	HTLV-1	95	9,4	1,5	HTLV-2
10	8,6	9,3	HTLV-1	53	13,3	8,8	HTLV-1 e HTLV-2	96	11,9	10,1	HTLV-1
11	7,6	7,3	HTLV-1	54	13,4	9,6	HTLV-1	97	12,5	10,1	HTLV-1
12	5,2	6,3	HTLV-2	55	13,0	6,9	HTLV-2	98	12,0	8,9	HTLV-1
13	9,9	8,8	HTLV-1	56	13,1	7,8	HTLV-1	99	11,7	7,1	HTLV
14	10	8,3	HTLV-2	57	12,8	6,1	HTLV-2	100	11,5	6,1	HTLV-1
15	9,8	8,5	HTLV-1	58	12,8	7,2	HTLV-1	101	12,5	9,6	HTLV-2
16	7,5	10	HTLV-1	59	13,1	8,1	HTLV-1	102	9,1	2,4	HTLV-2
17	7,5	8,3	HTLV-2	60	12,9	9,0	HTLV-1	103	11,3	2,1	HTLV-2
18	7	7,3	HTLV-2	61	13,1	9,4	HTLV-1	104	11,5	8,7	HTLV-2
19	6,4	6,3	HTLV-2	62	13,1	8,2	HTLV-2	105	11,4	8,5	HTLV-1
20	7,4	9,6	HTLV-1	63	13,4	9,0	HTLV-1	106	12,0	7,3	HTLV-2
21	4,3	3,5	HTLV-1	64	2,4	1,1	HTLV-2	107	11,4	3,5	HTLV-2
22	6,4	7,1	HTLV-1	65	13,3	9,5	HTLV-1	108	11,8	5,4	HTLV
23	7,9	6,1	HTLV	66	13,6	9,7	HTLV-1	109	12,5	6,7	Indeterminado
24	5,9	6,8	HTLV-1	67	1,1	0,2	HTLV-2	110	12,6	5,9	Indeterminado
25	5,8	9,6	HTLV-2	68	13,6	9,6	HTLV-1	111	6,4	1,6	Indeterminado
26	5	7,7	HTLV-1	69	8,5	2,0	HTLV-2	112	12,5	6,8	Indeterminado
27	5,6	9,8	HTLV-1	70	12,6	4,1	HTLV	113	5,3	2,4	Indeterminado
28	5,5	2,2	HTLV-2	71	12,9	8,6	HTLV-2	114	5,0	2,0	Indeterminado
29	9,7	9,4	HTLV-1	72	12,0	6,9	HTLV-1	115	0,9	0,1	Indeterminado
30	9,8	9,5	HTLV-1	73	12,9	9,0	HTLV-2	116	0,3	1,4	Indeterminado
31	9,3	7,4	HTLV-1	74	12,9	9,5	HTLV-1	117	0,9	0,1	Indeterminado
32	7	9,5	HTLV-1	75	12,6	7,9	HTLV-2	118	1,3	0,4	Negativo
33	6,9	8,2	HTLV-1	76	11,7	5,8	HTLV-2	119	0,5	1,2	Negativo
34	5,6	4	HTLV-1	77	11,6	9,4	HTLV-1	120	6,6	4,6	Negativo
35	6,9	9,6	HTLV-1	78	11,8	9,7	HTLV-1	121	7,6	2,8	Negativo
36	6,7	8,4	HTLV-1	79	0,9	0,1	HTLV	122	1,6	0,4	Negativo
37	5,4	7	HTLV-2	80	12,7	6,0	HTLV-1	123	2,3	0,2	Negativo
38	10,4	8,6	HTLV-2	81	12,7	8,2	HTLV-2	124	11,9	5,2	Negativo
39	10,4	9,7	HTLV-1	82	12,7	8,5	HTLV-2	125	3,7	5,4	Negativo
40	6,5	6,6	HTLV-2	83	12,0	4,4	HTLV-2	126	1,5	2,3	Negativo
41	5,7	6,5	HTLV-2	84	13,2	7,1	HTLV-1	127	0,3	1,3	Negativo
42	2,4	0,9	HTLV-2	85	13,3	5,2	HTLV-1				
43	11	6,5	HTLV-2	86	9,9	9,0	HTLV-1				

**Legenda:** ID – Identificação da amostra, M – DO/CO obtida no Murex, R – DO/CO obtida no REM, Resultado (segundo critérios descritos em Casuística e Métodos). Destaque: moldura em verde (amostras com perfil inconclusivo por R), moldura em azul (amostras com perfil inconclusivo em R e M), e moldura em laranja (amostras com perfil inconclusivo por M).

No G1 as médias de DO/CO obtidas pelos dois *kits* considerando-se como resultado final a combinação do perfil apresentado no WB + qPCR, LIA + qPCR e LIA + PCR-RFLP, em análise multiparamétrica mostraram diferença significativa para os pacientes com HTLV-1, HTLV-2 e HTLV. Quando analisados pareando-se os resultados obtidos nos testes Murex e REM, não houve diferença significativa (**Anexo 8.3**). No G2 os resultados dos WB + qPCR, WB + PCR-RFLP, LIA + qPCR e LIA + PCR-RFLP mostraram diferenças significantes em pacientes com HTLV-1, HTLV-2 e HTLV (**Anexo 8.4**). E quando analisados pareando-se Murex e REM, apresentaram diferenças estatísticas no WB + qPCR, WB + PCR-RFLP, LIA + qPCR e LIA + PCR-RFLP em pacientes HTLV-1 e HTLV-2 positivos (**Anexo 8.4**). Para HTLV houve diferença apenas quando foram analisados pareados LIA + qPCR (**Anexo 8.4 H**).

A avaliação de desempenho dos *kits* EIA apresentada na **Tabela 3**, mostra entre outros parâmetros que a sensibilidade e especificidade do *kit* Murex foram de 99,0% e 99,5% e do REM 97,2% e 99,5%, respectivamente.

**Tabela 3.** Valores de sensibilidade e especificidade relativas dos EIA aplicados a cada grupo e à população de coinfectados HTLV-1/2 / HIV-1.

Parâmetros	EIA	Grupo 1	Grupo 2	Total
Sensibilidade	Murex	100,0%	98,3%	<b>99,1%</b>
	Relativa REM	98,0%	96,6%	<b>97,2%</b>
Especificidade	Murex	99,9%	99,0%	<b>99,5%</b>
	Relativa REM	100,0%	98,9%	<b>99,5%</b>

**Legenda:** EIA – *Enzyme Immunoassay*.

## 4.2. Desempenho dos testes confirmatórios

Considerando-se o resultado positivo detectado em pelo menos um dos quatro testes confirmatórios, a infecção por HTLV foi comprovada em 108 amostras: 56 HTLV-1, um HTLV-1 e HTLV-2 [ID53], 45 HTLV-2 e seis HTLV. As demais amostras reagentes na triagem apresentaram perfil indeterminado (nove) ou foram negativas (10), **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Frequência de resultado final apresentado pelas amostras reagentes na triagem para detecção de anticorpos específicos para infecção por HTLV-1/2 em população de coinfectados por HIV-1.

Resultado Final	Grupo 1	%	Grupo 2	%	Total	%
HTLV-1	27	21,2	29	22,8	56	44,1
HTLV-1 + HTLV-2	–	–	1	0,8	1	0,8
HTLV-2	21	16,5	24	18,9	45	35,4
HTLV	2	1,6	4	3,2	6	4,7
Indeterminado	–	–	9	7,1	9	7,1
Negativo	1	0,8	9	7,1	10	7,9
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>40,1</b>	<b>76</b>	<b>59,9</b>	<b>127</b>	<b>100,0</b>

A **Tabela 5** mostra os resultados individuais obtidos nos ensaios confirmatórios sorológicos e moleculares, em que houve concordância total entre eles em 50,9 % das amostras. Resultados positivos foram detectados em três ensaios confirmatórios em 25,0% das amostras analisadas, 17,6% em dois ensaios e 6,5 % em apenas um ensaio. É importante ressaltar que em cinco amostras não foi possível realizar a PCR-RFLP pelo esgotamento da alíquota de DNA, e mais cinco amostras de soro foram submetidas ao LIA e WB.

Quanto às amostras que resultaram negativas nos ensaios moleculares e indeterminadas nos sorológicos, os perfis de indeterminação e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 6**.

**Tabela 5.** Resultados individuais e finais nos ensaios confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) das amostras positivas para infecção por HTLV-1/2 em pacientes coinfectados por HIV-1.

ID	WB	LIA	q PCR				PCR-RFLP	Resultado Final
			Cq 1	Cq 2	Cq 3	q PCR		
1	HTLV-2	HTLV-2	0	0	32	Negativo	HTLV-2	HTLV-2
2	HTLV	HTLV	0	0	33	Negativo	Negativo	HTLV
3	HTLV-1	HTLV-1	30	0	26	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
4	HTLV	HTLV	0	0	26	Negativo	HTLV-1	HTLV-1
5	HTLV-2	HTLV-2	0	0	30	Negativo	Negativo	HTLV-2
6	HTLV-1	HTLV-1	0	0	30	Negativo	Negativo	HTLV-1
7	Indeterminado	HTLV-1	0	0	26	Negativo	HTLV-1	HTLV-1
8	HTLV-2	HTLV-2	0	0	31	Negativo	Negativo	HTLV-2
9	HTLV-1	HTLV-1	35	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
10	HTLV-1	HTLV-1	29	0	24	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
11	HTLV-1	HTLV-1	0	0	30	Negativo	Negativo	HTLV-1
12	Indeterminado	HTLV-2	0	39	27	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
13	HTLV-1	HTLV-1	35	0	28	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
14	HTLV-2	HTLV-2	0	0	29	Negativo	Negativo	HTLV-2
15	HTLV-1	HTLV-1	39	0	25	HTLV-1	Negativo	HTLV-1
16	HTLV	HTLV	37	0	28	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
17	HTLV-2	HTLV-2	0	35	26	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
18	HTLV	HTLV-2	0	0	28	Negativo	Negativo	HTLV-2
19	Indeterminado	HTLV-2	0	0	29	Negativo	Negativo	HTLV-2
20	HTLV-1	HTLV-1	0	0	29	Negativo	HTLV-1	HTLV-1
21	Indeterminado	HTLV	0	0	32	Negativo	HTLV-1	HTLV-1
22	HTLV-1	HTLV-1	31	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
23	HTLV	HTLV	0	0	34	Negativo	Negativo	HTLV
24	HTLV-1	HTLV-1	37	0	26	HTLV-1	Negativo	HTLV-1
25	HTLV	HTLV-2	0	38	27	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
26	HTLV-1	HTLV-1	0	0	31	Negativo	Negativo	HTLV-1
27	HTLV-1	HTLV-1	32	0	29	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
28	Indeterminado	HTLV-2	0	0	27	Negativo	Negativo	HTLV-2
29	HTLV-1	HTLV-1	35	0	31	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
30	HTLV-1	HTLV-1	30	0	26	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
31	HTLV-1	HTLV-1	35	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
32	HTLV-1	HTLV-1	37	0	28	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
33	HTLV-1	HTLV-1	34	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
34	HTLV-1	HTLV-1	0	0	25	Negativo	HTLV-1	HTLV-1
35	HTLV-1	HTLV-1	30	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
36	HTLV-1	HTLV-1	38	0	28	HTLV-1	Negativo	HTLV-1
37	Indeterminado	HTLV-2	0	0	31	Negativo	Negativo	HTLV-2

Continuação Tabela 5.

ID	WB	LIA	Cq 1	Cq 2	Cq 3	q PCR	PCR-RFLP	Resultado Final
38	HTLV-2	HTLV-2	0	33	27	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
39	HTLV-1	HTLV-1	35	0	30	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
40	Indeterminado	HTLV-2	0	33	26	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
41	HTLV-2	HTLV-2	0	33	29	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
42	Indeterminado	HTLV-2	0	37	28	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
43	HTLV-2	HTLV-2	0	29	27	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
44	HTLV-2	HTLV-2	0	40	29	HTLV-2	HTLV-1	HTLV-2
45	Indeterminado	HTLV	0	40	35	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
46	HTLV-1	HTLV-1	0	0	36	Negativo	HTLV-1	HTLV-1
47	HTLV-2	HTLV-2	0	0	32	Negativo	HTLV-2	HTLV-2
48	HTLV-2	HTLV-2	0	0	39	Negativo	HTLV-1	HTLV-2
49	HTLV-1	HTLV-1	36	0	30	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
50	HTLV-2	HTLV-2	0	32	31	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
51	HTLV-1	HTLV-1	39	0	28	HTLV-1	Negativo	HTLV-1
52	HTLV-1	HTLV-1	29	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
53	HTLV-1 e HTLV-2	HTLV-1 e HTLV-2	36	37	30	HTLV-1 e HTLV-2	NR	HTLV-1 e HTLV-2
54	HTLV-1	HTLV-1	35	0	29	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
55	HTLV-2	HTLV	0	0	25	Negativo	HTLV-2	HTLV-2
56	HTLV-1	HTLV-1	33	0	26	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
57	HTLV-2	HTLV-2	0	38	26	HTLV-2	NR	HTLV-2
58	HTLV-1	HTLV-1	39	0	33	HTLV-1	NR	HTLV-1
59	HTLV-1	HTLV-1	NR	NR	NR	NR	NR	HTLV-1
60	Indeterminado	HTLV	36	0	27	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
61	HTLV-1	HTLV-1	30	0	27	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
62	HTLV-2	HTLV-2	0	40	27	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
63	HTLV-1	HTLV-1	0	0	24	Negativo	Negativo	HTLV-1
64	HTLV-2	HTLV-2	0	32	24	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
65	HTLV-1 e HTLV-2	Indeterminado	29	0	24	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
66	HTLV-1	HTLV-1	35	0	29	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
67	HTLV-2	Indeterminado	0	0	25	Negativo	Negativo	HTLV-2
68	HTLV-1	HTLV-1	28	0	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
69	Negativo	HTLV	0	0	29	Negativo	Negativo	HTLV
70	HTLV	HTLV-2	NR	NR	NR	NR	NR	HTLV-2
71	Indeterminado	HTLV-2	0	28	24	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
72	HTLV-1	HTLV-1	32	0	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
73	Indeterminado	HTLV-2	0	39	24	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
74	HTLV-1	HTLV-1	0	0	30	Negativo	Negativo	HTLV-1
75	HTLV-2	HTLV-2	0	40	37	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
76	HTLV-2	HTLV-2	0	39	26	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
77	HTLV-1	HTLV-1	0	0	23	Negativo	NR	HTLV-1
78	HTLV-1	HTLV-1	24	0	21	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
79	Indeterminado	HTLV	0	0	26	Negativo	Negativo	HTLV
80	HTLV-1	HTLV-1	0	0	24	Negativo	Negativo	HTLV-1
81	HTLV-2	HTLV-2	0	36	22	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
82	Indeterminado	HTLV-2	0	29	23	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
83	Indeterminado	HTLV-2	0	0	22	Negativo	HTLV-2	HTLV-2
84	Indeterminado	HTLV-1	31	0	26	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
85	HTLV-1	HTLV	NR	NR	NR	NR	NR	HTLV-1
86	HTLV-1	HTLV-1	27	0	21	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
87	HTLV-1	HTLV-1	28	0	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
88	HTLV-1	HTLV-1	27	0	22	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1

Continuação Tabela 5.

ID	WB	LIA	Cq 1	Cq 2	Cq 3	q PCR	PCR-RFLP	Resultado Final
89	Indeterminado	HTLV-2	0	35	22	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
90	HTLV-2	HTLV-2	0	29	24	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
91	HTLV-1	HTLV-1	29	0	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
92	HTLV-1	HTLV-1	26	0	22	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
93	HTLV-2	HTLV-2	0	39	27	HTLV-2	Negativo	HTLV-2
94	HTLV-2	HTLV-2	0	38	24	HTLV-2	HTLV-1	HTLV-2
95	HTLV-2	HTLV-2	0	35	23	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
96	HTLV-1	HTLV-1	28	0	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
97	HTLV-1	HTLV-1	30	0	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
98	HTLV-1	HTLV-1	27	0	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
99	HTLV	HTLV	NR	NR	NR	NR	NR	HTLV
100	HTLV-1	HTLV-1	36	0	21	HTLV-1	NR	HTLV-1
101	HTLV-2	HTLV-2	0	27	23	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
102	Negativo	Indeterminado	0	0	22	Negativo	HTLV-2	HTLV-2
103	HTLV-2	HTLV-2	0	26	20	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
104	HTLV-2	HTLV-2	0	0	22	Negativo	Negativo	HTLV-2
105	HTLV-1	HTLV-1	26	0	22	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
106	HTLV-2	HTLV-2	0	32	22	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
107	HTLV-2	HTLV-2	0	33	24	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
108	HTLV	HTLV	NR	NR	NR	NR	NR	HTLV

**Legenda:** ID – Identificação da amostra, Cq - Ciclo de quantificação, Cq1- *pol*/ HTLV-1, Cq 2- *pol*/ HTLV-2, Cq 3- albumina (controle endógeno utilizado), NR – Não Realizado (amostras de soro ou com DNA esgotado). Destaque: moldura em azul (amostra com resultado discordante na PCR-RFLP).

**Tabela 6.** Perfis de resultados indeterminados nos ensaios confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) negativos apresentados pelas amostras reagentes na triagem de infecção por HTLV-1/2 em pacientes coinfectados por HIV-1.

ID	Perfil WB	Perfil LIA	q PCR			PCR-RFLP	Resultado Final	
			Cq 1	Cq 2	Cq 3			
109	GD21	gp21I/II	0	0	27	Negativo	Negativo	Indeterminado
110	rgp 46-II, GD21	gp21I/II	0	0	34	Negativo	Negativo	Indeterminado
111	rgp46-1, p24 (traços leves) e GD21	gp21I/II	0	0	32	Negativo	NR	Indeterminado
112	rgp46-2, GD21	gp21I/II	0	0	27	Negativo	Negativo	Indeterminado
113	rgp46-1, p24 (traços leves) e GD21	gp21I/II	0	0	25	Negativo	Negativo	Indeterminado
114	rgp46-1 e GD21	gp21 I/II	0	0	26	Negativo	Negativo	Indeterminado
115	p24 e p19 (traços leves)	gp21 I/II	0	0	26	Negativo	Negativo	Indeterminado
116	p24	p19I/II, p24I/II	0	0	33	Negativo	Negativo	Indeterminado
117	p24, GD21 (traços leves)	gp21 I/II	0	0	28	Negativo	Negativo	Indeterminado

**Legenda:** ID – Identificação, Cq - Ciclo de quantificação, Cq1- *pol*/ HTLV-1, Cq 2- *pol*/ HTLV-2, Cq 3- albumina (controle endógeno utilizado), NR – Não Realizado

Em relação à sensibilidade apresentada pelos testes confirmatórios, a **Tabela 7** mostra a porcentagem de cada um dos quatro ensaios quando aplicados ao G1, G2 e quando avaliados juntos. Destaca-se que ao aplicá-los nas amostras de pacientes coinfectados por HIV-1, o melhor desempenho como teste confirmatório e discriminatório da infecção por HTLV foi apresentado pelo LIA (97,2%) seguido pelo WB (82,4%), qPCR (68,9%), PCR-RFLP (68,4%). A PCR-RFLP mostrou especificidade abaixo do esperado como teste molecular, pois três das amostras HTLV-2 positivas comprovadas por outros ensaios, foram identificadas como HTLV-1 nessa técnica molecular (**Tabela 5** ID44, 48 e 94); e estes resultados foram mantidos quando a reação foi repetida.

Analisando-se a sensibilidade relativa dos ensaios sorológicos confirmatórios em relação aos tipos virais separadamente, para HTLV-1 o LIA mostrou sensibilidade relativa de 88,9% no G1 e 86,7% no G2, e o WB 85,2% no G1 e 90,0% no G2; e em ambos os testes a sensibilidade relativa foi de 89,5%. Estes ensaios tiveram melhor desempenho do que os ensaios moleculares, em que a PCR-RFLP mostrou sensibilidade relativa de 77,8% no G1 e 83,3% no G2, e a qPCR 66,7% no G1 e 80,0% no G2. O teste que apresentou melhor discriminação para HTLV-2 foi o LIA [(95,2%) G1 e (84,0%) G2] seguido pela qPCR [(52,4%) G1 e (76,0%) G2], WB [(57,0%) G1 e (72,0%) G2] e por último a PCR-RFLP [(43,0%) G1 e (68,0%) G2] (**Tabela 8**).

**Tabela 7.** Valores de sensibilidade e especificidade relativas apresentados pelos testes confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) aplicados em cada grupo e nos indivíduos coinfetados por HTLV-1/2 / HIV-1.

Parâmetros	Ensaio	Grupo 1	Grupo 2	Geral
<b>Sensibilidade Relativa</b>	WB	82,0%	82,8%	<b>82,4%</b>
	LIA	100,0%	94,8%	<b>97,2%</b>
	q PCR	58,0%	79,2%	<b>68,9%</b>
	PCR-RFLP	62,5%	74,5%	<b>68,4%</b>
<b>Especificidade Relativa</b>	WB	100,0%	55,6%	<b>60,0%</b>
	LIA	100,0%	77,8%	<b>80,0%</b>
	q PCR	100,0%	100,0%	<b>100,0%</b>
	PCR-RFLP	50,0%	81,8%	<b>76,9%</b>

**Tabela 8.** Valores de sensibilidade relativa para cada tipo viral (HTLV-1 e HTLV-2) apresentado pelos testes confirmatórios sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) aplicados em cada grupo e nos indivíduos coinfetados por HTLV-1/2 / HIV-1.

	Ensaio	HTLV-1			HTLV-2		
		G1	G2	Total	G1	G2	Total
<b>Sensibilidade Relativa</b>	<b>WB</b>	85,2%	90,0%	<b>89,5%</b>	57,1%	72,0%	<b>65,2%</b>
	<b>LIA</b>	88,9%	86,7%	<b>89,5%</b>	95,2%	84,0%	<b>91,3%</b>
	<b>qPCR</b>	66,7%	80,0%	<b>76,4%</b>	52,4%	76,0%	<b>66,7%</b>
	<b>PCR-RFLP</b>	77,8%	83,3%	<b>80,4%</b>	42,9%	68,2%	<b>55,8%</b>

#### 4.3. Análise de Custo-Benefício dos Algoritmos

Considerando-se a indisponibilidade de um ensaio padrão ouro que seja 100,0% sensível ou próximo a este desempenho, para se chegar a

melhor combinação de testes confirmatórios para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2, é preciso avaliar não só a eficiência do ensaio, mas também o custo do teste e a viabilidade de sua execução em busca de mínimos possíveis pontos desfavoráveis para maximizar os benefícios (Caterino-de-Araujo et al., 2014).

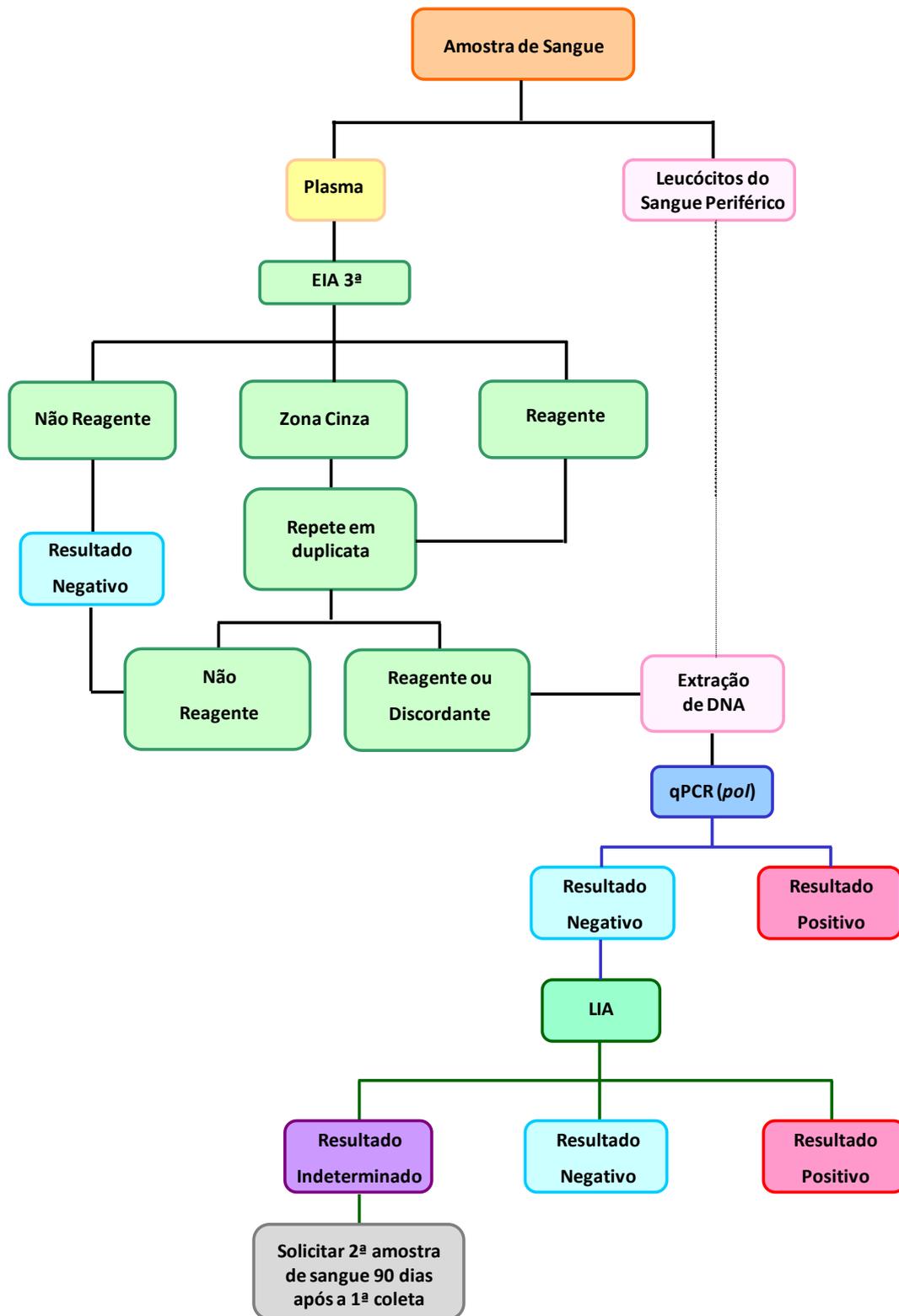
Desta forma, os arranjos de possíveis algoritmos de testes confirmatórios estão representados na **Tabela 9**, em que o algoritmo de menor custo para confirmar infecção por HTLV-1/2 foi o G (que usa a PCR-RFLP como primeiro teste confirmatório e o WB como complementar). Neste esquema sete amostras permaneceriam inconclusivas ou negativas [ID12, 19, 28, 37, 69, 73 e 79]. Portanto, o algoritmo de melhor custo-benefício poderia ser o C. Porém, levando-se em consideração a sensibilidade dos testes, o algoritmo de escolha deveria incluir o LIA (D).

Em resumo, o algoritmo de testes confirmatórios com melhor custo-benefício seria composto pela qPCR como teste de primeira escolha e o LIA como ensaio complementar [**Figura 16 – Algoritmo D (Tabela 9)**]. Na impossibilidade de combinar ensaios, a confirmação da infecção por HTLV-1/2 poderia ser feita pelo LIA (**Figura 17**).

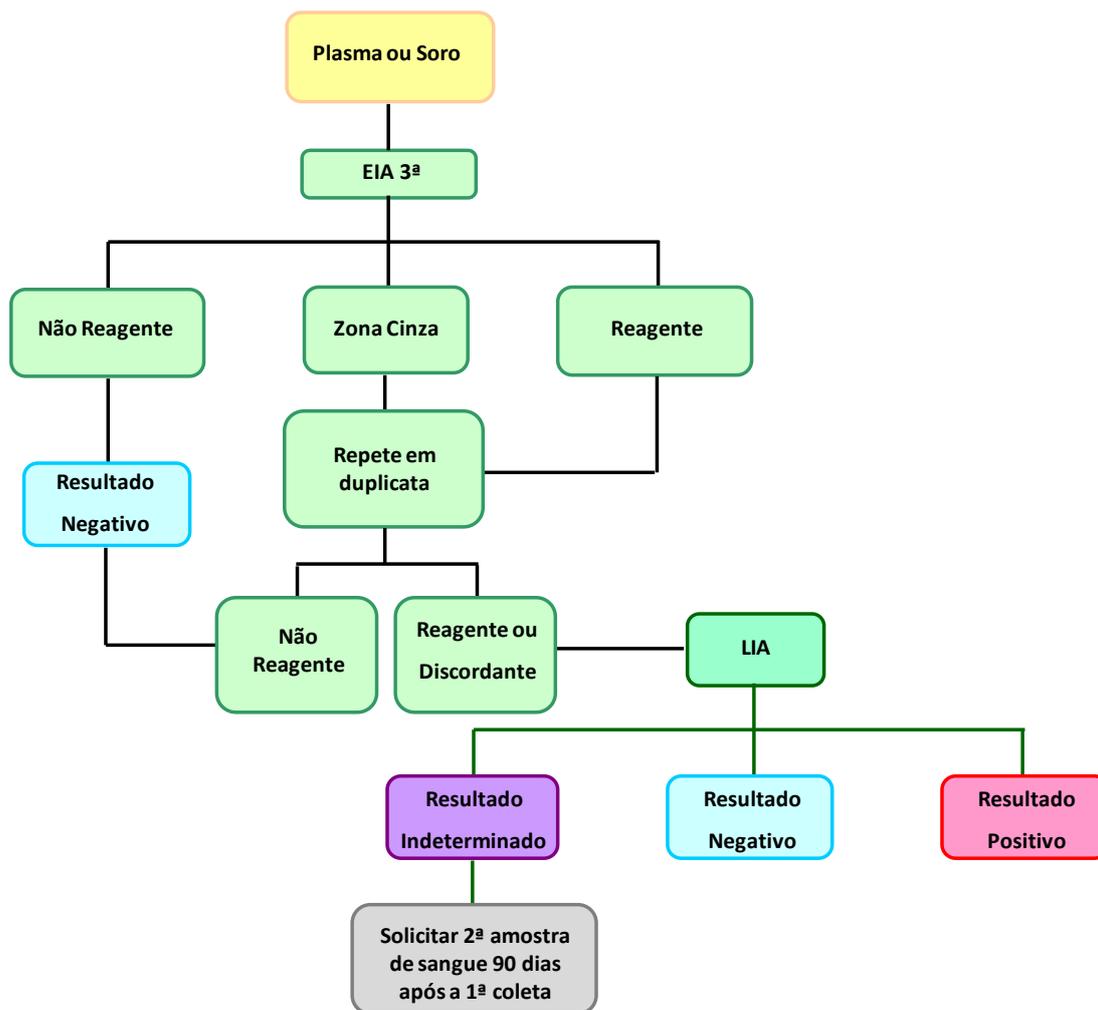
**Tabela 9.** Arranjo de quatro possíveis testes confirmatórios para compor o melhor algoritmo com relação ao custo-benefício para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 em população coinfetada por HIV-1.

		A		B		C		D	
		Teste	Custo	Teste	Custo	Teste	Custo	Teste	Custo
	<b>WB<sup>a</sup></b>			<b>LIA<sup>a</sup></b>		<b>q PCR<sup>a</sup></b>		<b>q PCR<sup>a</sup></b>	
	n= 127		26.670,00	n= 127	29.210,00	n= 121	10.036,95	n= 121	10.036,95
	<b>q PCR<sup>b</sup></b>			<b>q PCR<sup>b</sup></b>		<b>WB<sup>b</sup></b>		<b>LIA<sup>b</sup></b>	
	n= 43		3.566,85	n= 30	2.488,50	n= 55	11.550,00	n= 55	12.650,00
<b>Total</b>	<b>R\$</b>		<b>30.236,85</b>	<b>R\$</b>	<b>31.698,50</b>	<b>R\$</b>	<b>21.586,95</b>	<b>R\$</b>	<b>22.686,95</b>
		E		F		G		H	
		Teste	Custo	Teste	Custo	Teste	Custo	Teste	Custo
	<b>WB<sup>a</sup></b>			<b>LIA<sup>a</sup></b>		<b>PCR-RFLP<sup>a</sup></b>		<b>PCR-RFLP<sup>a</sup></b>	
	n= 127		26.670,00	n= 127	29.210,00	n= 121	1.633,50	n= 121	1.633,50
	<b>PCR-RFLP<sup>b</sup></b>			<b>PCR-RFLP<sup>b</sup></b>		<b>WB<sup>b</sup></b>		<b>LIA<sup>b</sup></b>	
	n= 43		580,50	n= 30	405,00	n= 55	11.550,00	n= 55	12.650,00
<b>Total</b>	<b>R\$</b>		<b>27.250,50</b>	<b>R\$</b>	<b>29.615,00</b>	<b>R\$</b>	<b>13.183,50</b>	<b>R\$</b>	<b>14.283,50</b>

**Legenda:** <sup>a</sup> – teste de 1ª escolha; <sup>b</sup> - teste complementar ao de 1ª escolha, [A, B, C, D, E, F, G e H] – possíveis algoritmos de testes confirmatórios da infecção por HTLV-1/2 em população HIV-1 positiva.



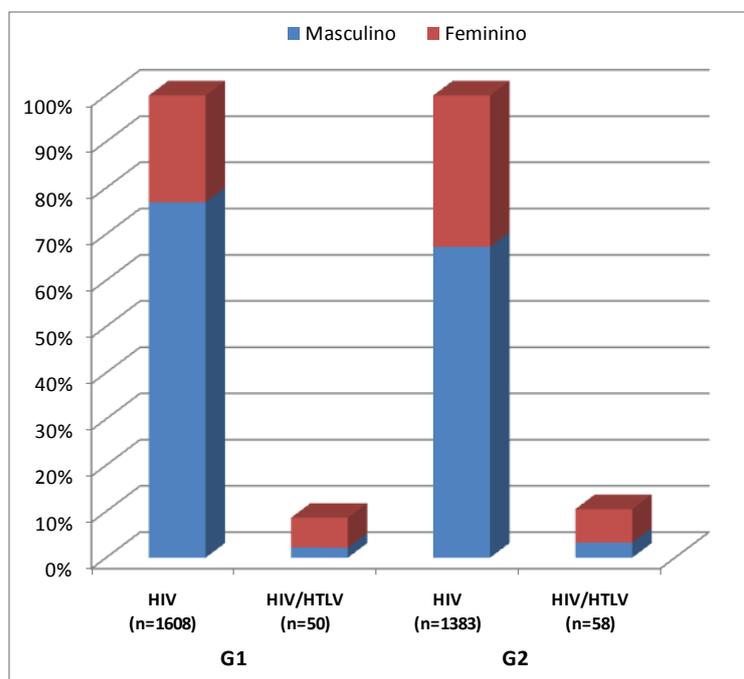
**Figura 12.** Algoritmo de testes laboratoriais sorológicos e moleculares para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos HIV-1 positivos, proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2016.



**Figura 13.** Algoritmo de testes laboratoriais sorológicos para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos HIV-1 positivos, proposto pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo em 2016.

#### 4.4. Características demográficas dos Grupos de indivíduos analisados em relação aos resultados obtidos

A **Figura 14** mostra a distribuição dos indivíduos, segundo o sexo, pertencentes aos dois distintos grupos G1 e G2, cujas amostras foram analisadas quanto ao *status* da infecção por HTLV-1/2. Apesar de a maioria dos indivíduos analisados serem do sexo masculino, houve maior frequência de pacientes do sexo feminino entre os coinfectados HIV/HTLV [G1 (6,45%) e G2 (7,28%)] em relação aos do sexo masculino [G1 (2,18%) e G2 (3,33%)]. Estes achados são ratificados pelos dados da **Tabela 10**, que ressalta a associação de coinfeção HIV/HTLV com o sexo feminino.



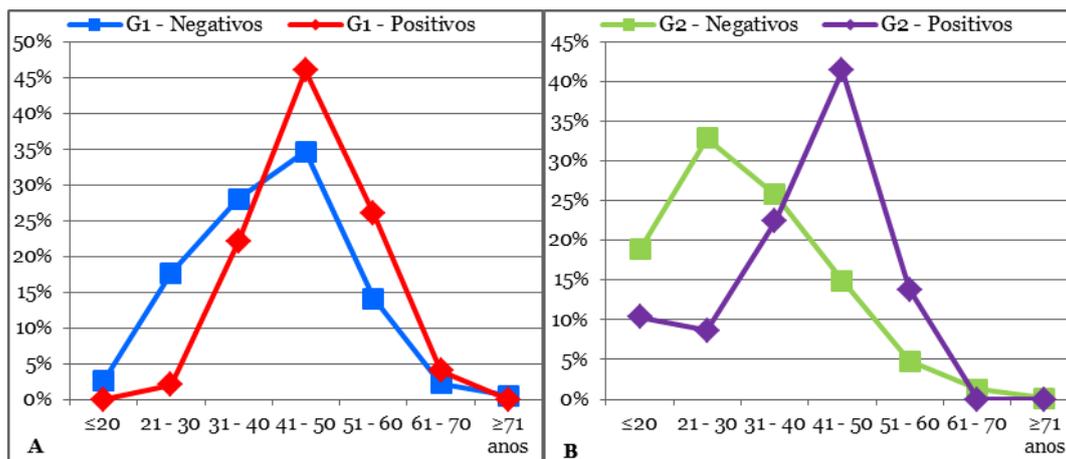
**Figura 14.** Distribuição de indivíduos, segundo o sexo, pertencentes aos dois grupos infectados por HIV-1 (G1 e G2), e de acordo com os resultados positivos e negativos para infecção por HTLV-1/2.

**Tabela 10.** Dados demográficos dos dois grupos que compreendem os indivíduos coinfectados com HIV-1.

Característica	HTLV-1 (N=57)	HTLV-2 (N=46)	HTLV (N=6)	OD (IC95%)
<b>Idade</b>				
<b>Grupo 1</b>	49,3 (28-66)	50,6 (45-68)	50,5 (48-53)	
<b>Grupo 2</b>	42,7 (18-62)	47,2 (32-64)	37,2 (24-51)	
<b>Sexo</b>				
<b>Feminino</b>				
<b>Grupo 1</b>	11 (40,7%)	12 (57,2%)	1 (50,0%)	<b>3.22 (1.76-5.88)</b>
<b>Grupo 2</b>	17 (56,7%)	10 (40,0%)	3 (75,0%)	<b>2.28 (1.31-4.00)</b>
<b>Masculino</b>				
<b>Grupo 1</b>	16 (59,3%)	9 (42,8%)	1 (50,0%)	<b>0.31 (0.17-0.57)</b>
<b>Grupo 2</b>	13 (43,3%)	15 (60,0%)	1 (25,0%)	<b>0.44 (0.25-0.77)</b>
<b>Total</b>				
<b>Grupo 1</b>	<b>27 (54,0%)</b>	<b>21 (42,0%)</b>	<b>2 (4,0%)</b>	<b>50</b>
<b>Grupo2</b>	<b>30* (50,8%)</b>	<b>25* (42,4%)</b>	<b>4 (6,8%)</b>	<b>58*</b>

**Legenda:** OD – Odds ratio, (IC95%) – Intervalo de confiança de 95%, \* - Uma amostra do G2 teve a infecção confirmada por ambos os tipos virais (HTLV-1 e HTLV-2).

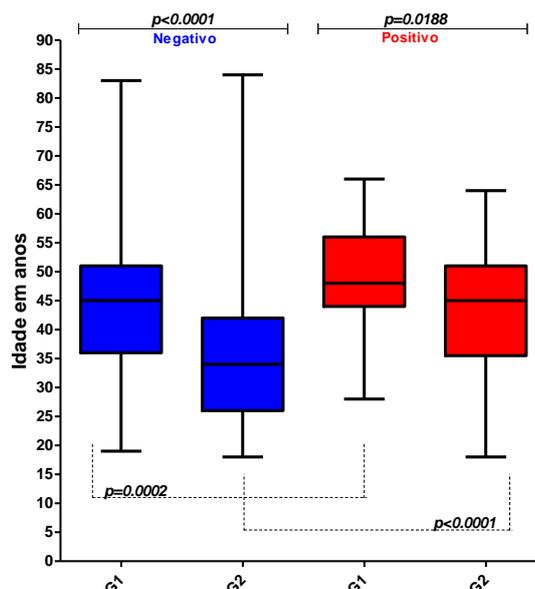
Em relação à idade, os pacientes negativos para a infecção por HTLV-1/2 de G1 se concentraram na faixa etária de 41 a 50 anos (34,7%), enquanto em G2 a distribuição foi mais heterogênea, com maior frequência dos 21 aos 30 anos (33,0%) (**Figura 15**). Nos pacientes coinfectados por HIV-1/HTLV, embora pertençam à faixa etária de 41 a 50 anos [G1 (46,0%) e G2 (41,4%)] (**Figura 15**), houve diferença significativa entre eles, conforme mostra a **Figura 16**.



**Figura 15.** Frequência de idades distribuídas em intervalos de 10 anos e classificadas quanto à positividade para infecção por HTLV-1/2 entre os dois grupos de pacientes HIV-1 positivos.

**Legenda:** A – Grupo 1 e B – Grupo 2.

A **Figura 16** mostra as diferenças estatísticas encontradas na análise do parâmetro idade pelo programa estatístico Mann-Whitney U-test. A população coinfetada apresentou maior idade em relação àquela infectada apenas pelo HIV-1, tanto no G1 ( $p=0.0002$ ) como no G2 ( $p<0.0001$ ). Houve também diferença entre G1 e G2, quando foram comparados os pacientes que resultaram negativos ( $p<0.0001$ ), assim como os positivos ( $p=0.0188$ ) para HTLV-1/2.



**Figura 16.** Resultados obtidos a partir da frequência de idade dos dois grupos de pacientes HIV-1 positivos e coinfectados com HTLV-1/2. Análise por meio de GraphPad Prism e programa estatístico Mann-Whitney U.

Por fim, analisando-se todos os resultados obtidos nos testes de triagem e confirmatórios, determinou-se a prevalência de 3,6% de infecção por HTLV em pacientes infectados por HIV-1 em São Paulo (**Tabela 11**). As prevalências individuais (G1 vs. G2) não apresentaram diferença estatística ( $p=0.113$ ). Os resultados de G1 foram já publicados (Caterino-de-Araujo et al., 2015).

**Tabela 11.** Prevalência da infecção por HTLV-1/2 nos dois grupos que compreendem os indivíduos coinfectados por HIV-1.

	HTLV-1/2	%	Negativo	%	Total
<b>Grupo 1</b>	50	3,1	1558	96,9	<b>1608</b>
<b>Grupo 2</b>	58	4,2	1325	95,8	<b>1383</b>
<b>Total</b>	108	3,6	2883	96,4	<b>2991</b>

## 5. Discussão

Vários estudos têm obtido resultados insatisfatórios na triagem sorológica que indicam a necessidade de efetuar a combinação de testes para melhorar a precisão no diagnóstico, independentemente de ser de regiões com alta ou baixa prevalência e de serem populações de baixo ou alto risco para a infecção por HTLV. Mesmo o Japão, que apresenta regiões endêmicas apenas para o HTLV-1, tem problemas com o seu diagnóstico. Kobayashi e colaboradores (1998) encontraram 44,7% de inconsistência entre os resultados obtidos nos testes de triagem e confirmatórios [aglutinação de partículas (PA), EIA, IFI e RIP] em amostras de banco de sangue. O teste PA teve o melhor desempenho, pelo fato de efetuar também a captura de IgM e por ter apresentado menor número de resultados falso-negativos. Em população de alto risco, Verdonck (2008) confirmou 86 LIA positivos, um com perfil indeterminado e dois negativos, dentre eles 6,7% (n=6) apresentaram resultado discordante na triagem por três EIA, em que 50,0% (n=3) tiveram a infecção confirmada; por conseguinte, utilizando-se apenas um *kit* poderia induzir resultados falso-negativos.

Na Argentina o grande problema observado na triagem em bancos de sangue se refere aos resultados falso-positivos, pela ausência de um teste que apresente sensibilidade e especificidade de 100,0%, o que causa o indevido descarte de bolsas que são apropriadas para doação de hemoderivados (Berini et al., 2008 e Moreno et al., 2013).

Na triagem de amostras dos pacientes do presente estudo (população HIV-1 positiva), foram detectadas 11 amostras com resultados discordantes entre os dois EIA utilizados (Murex e REM). Destas amostras, em duas a infecção por HTLV-2 foi confirmada, em uma não foi possível discriminar o tipo viral (HTLV), três permaneceram inconclusivas, e cinco foram consideradas negativas após a análise nos testes confirmatórios. Isto reforça a necessidade de submeter amostras com DO/CO na zona cinza ( $\leq 20\%$  do *cut off*) à análise pelos testes confirmatórios antes de concluir seus resultados, principalmente quando a triagem sorológica utilizar apenas um ensaio. Estes resultados também confirmam dados anteriormente obtidos (Jacob et al., 2007; 2008 e 2009).

O critério para definir zona cinza pode variar de acordo com a população analisada, quando apresenta alto ou baixo risco para infecção por HTLV. Em bancos de sangue normalmente adota-se como zona cinza as amostras com relação DO/CO  $\leq 10\%$  do ponto de corte (Carneiro-Proietti et al. 2012), enquanto no Instituto Adolfo Lutz é utilizado  $\leq 20\%$  do *cut off*.

Apesar da inconsistência de 8,7% apresentada pelos ensaios utilizados na triagem, notou-se a diminuição no número de discordâncias. Este achado reflete a melhoria quanto à sensibilidade e especificidade dos testes, com a evolução das gerações dos *kits* EIA ao passar dos anos (Jacob et al., 2007; 2008 e 2009 e Caterino-de-Araujo, 2009).

No entanto, a sensibilidade dos testes de triagem para detectar a infecção por HTLV-2 neste estudo, ainda é um pouco inferior à do HTLV-1

(95,0% vs. 100,0%), corroborando os achados de Andersson et al. (1999) ao aplicarem dois painéis de soros [um da Suécia e outro da África Ocidental (Guiné-Bissau), regiões de baixa e alta prevalência, respectivamente]. Esses autores empregaram 14 ensaios de diferentes formatos, fabricantes e/ou composição antigênica (PA, EIA e CIA), e a sensibilidade dos testes para HTLV-2 variou de 86,0 a 100,0%, sendo mais alta nos *kits* de 3ª geração. Os estudos desenvolvidos por Andersson et al (1999) e no trabalho de Campos et al. (2015), mostram que as absorvâncias obtidas nas amostras HTLV-2 são em geral mais baixas em relação às de HTLV-1, mesmo nos EIA de 3ª geração que mostram maiores valores das razões DO/CO. Este fato sugere que os antígenos (peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes de *env* e *core*) utilizados nos *kits* EIA de 3ª geração não estão adsorvidos na mesma proporção para ambos os tipos virais, ou não apresentam alta sensibilidade para HTLV-2 em particular.

É importante reforçar que os resultados falso-positivos e falso-negativos descritos na literatura, em sua maioria, são referentes às amostras de banco de sangue. Em população coinfetada por HIV-1, há poucos relatos que detalham obstáculos para concluir o diagnóstico. Porém, além de problemas intrínsecos dos testes que falham na detecção de alguns pacientes infectados, adiciona-se a possibilidade de alteração da resposta imune em decorrência de infecção por outros retrovírus. Schüpbach e colaboradores (1988) associaram os resultados HTLV falso-positivos ao alto estímulo do sistema imunológico tanto em doadores de sangue, como na população HIV positiva, em que os anticorpos inespecíficos

(predominantemente IgM polirreativos) presentes no plasma se ligam, embora fracamente, com uma variedade de diferentes antígenos e estruturalmente não relacionados.

Para entender os resultados falso-positivos nos testes para a detecção de infecções virais (HIV, HTLV, HBV e HCV) em amostras de doadores de sangue, Vo et al. (2016) analisaram vários parâmetros e notaram que para HTLV, as amostras falso-positivas eram na maioria de mulheres com idade entre 25 a 44 anos, e a ocorrência de número relevante de DST quando comparado aos demais grupos (18,0% vs. 9,0%). Estes dados se contrapõem aos encontrados no presente estudo, pois das 12 amostras reagentes de SAE de São Paulo, porém sem confirmação, oito eram de indivíduos do sexo masculino com média de idade de 37,7 anos (mínima de 20 e máxima de 52 anos). Estes resultados confirmam aqueles obtidos em anos anteriores no mesmo laboratório na análise de pacientes de CRT-A (Jacob et al., 2008).

A etapa de confirmação diagnóstica persiste em ser um desafio, uma vez que não há padrão ouro, pela ausência de consenso em relação à eficiência do ensaio confirmatório a ser utilizado, pois é variável de acordo com as populações de risco estudadas. No entanto, o WB ainda é o teste mais utilizado por ser de fácil execução e não requerer infraestrutura complexa em comparação aos ensaios moleculares.

Contudo, resultados WB indeterminados na infecção por HTLV-1/2 ainda são problema mundialmente recorrente, especialmente em áreas

endêmicas. Embora a importância clínica e epidemiológica destes resultados ainda não esteja completamente esclarecida, diversos estudos em diferentes regiões do mundo fornecem evidências para a necessidade de investigar mais a fundo os padrões indeterminados, sobretudo em regiões endêmicas para HTLV.

Na população coinfetada por HIV-1 estudada, o WB apresentou 23,6% (30/127) de amostras com perfis indeterminados. Quando submetidas à análise por LIA ou PCR: em quatro a infecção foi excluída, nove permaneceram inconclusivas e 17 foram positivas (12 para HTLV-2, quatro para HTLV-1 e uma para HTLV). O percentual de indeterminados esclarecido pelo ensaio molecular foi semelhante aos achados pelos grupos como de Zanjani (2010) que analisou 40 amostras WB indeterminado de doadores de sangue no Iran, e obteve cinco (12,5%) amostras positivas para HTLV-1 por PCR. Costa e Segurado (2009) constataram que de 0,98% de WB indeterminados em doadores de sangue no Brasil, 9,2% resultaram em PCR positivo, Mangano et al. (2004) estudaram 89 amostras de soro indeterminadas em banco de sangue argentino, e relataram que 13,8% eram HTLV-1/2 positivo no PCR. Ainda em população argentina, Berini et al. (2007) avaliaram 83 amostras com WB indeterminados, e quando testadas por PCR, 13,2% foram positivas. Santos et al. (2003) testaram 41 amostras com resultados WB indeterminados, coletadas de indivíduos de Fortaleza, e encontraram 22,0% de positividade no PCR. Por outro lado, em regiões não endêmicas, os estudos revelaram resultados contrários; Lal et al. (1992) ao estudarem o sangue de doadores nos EUA, encontraram 0,14% de

resultados indeterminados e todos PCR negativos. Da mesma forma, Rouet et al. (2001) detectaram 0,4% de WB indeterminado em doadores de sangue caribenhos com resultados de PCR negativos.

Em relação aos padrões de WB indeterminado, Berini et al. (2007) notaram que a reatividade para o padrão HGIP [padrão HTLV-1 *gag* indeterminado (p19, p26, p28, p23 e p53)] ou reatividade apenas para a p24 em indivíduos com baixo risco, mesmo originários de regiões endêmicas, não estava associado de fato à infecção por HTLV (Rouet et al., 2001; Filippone et al., 2012, Canépa et al., 2015). Apenas um indivíduo com HAM/TSP, cuja amostra apresentou padrão HGIP no WB teve a infecção confirmada por HTLV-1 por PCR (Waziri et al., 2000). Os perfis indeterminados com reatividade para *env* ou *gag* (exceto padrão HGIP) são indicativos de período de soroconversão, principalmente quando apresentam GD21 (Berini et al., 2007; Jacob et al., 2008).

Diferentemente da maioria dos estudos que costumam apresentar perfis WB indeterminado com *env* ou *gag*, o padrão mais encontrado neste estudo e que tiveram a infecção confirmada foi a combinação de uma banda de *env* e uma de *gag* (70,6%). Enquanto as amostras que permaneceram inconclusivas apresentaram maior reatividade para envelope em relação à *gag* (43,0% vs. 28,5%). A maior reatividade para *env* (rgp46 ou GD21) foi encontrado por Zanjani et al. (2010) no Iran, Lu e Chen (2003) em Taiwan e Mangano et al. (2004) na Argentina, enquanto os resultados de WB de Rouet et al. (2001) no Caribe, Costa et al. (2009) no Brasil, Lal et al. (1992) nos EUA, Cesaire et al. (1999) na Martinica e Berini et al. (2007) na

Argentina foram em sua maioria os padrões *gag* indeterminado. Martins et al. (2010) detectaram maior frequência de banda única de p24 nas amostras negativas no PCR. Há que se ressaltar que de acordo com a população em estudo (de alto ou baixo risco) e do tipo viral com o qual o paciente teve contato, pode haver predomínio de um ou outro padrão, como demonstrado anteriormente por Jacob et al. (2008).

Presumem-se inúmeras justificativas para os diferentes padrões de perfis indeterminados. Alguns estudos associam a reatividade cruzada com os anticorpos produzidos contra outros agentes, por exemplo, peptídeos de *Plasmodium falciparum* [antiga proteína p21e, substituída pela proteína recombinante GD21], retrovírus endógenos [proteína de 28kDa de HERV-1 com reatividade cruzada com os anticorpos anti-p19 de HTLV-1], vírus linfotrópico de células T símia do tipo 1 [STLV-1] e varicela-zoster [p22 de VZV com reatividade com os anticorpos anti-p19 de HTLV-1] (Soldan et al., 1999; Mahieux et al., 2000; Abrams 2011; Bank et al., 1992; Sato et al., 1992 e Vandamme et al., 1997).

Outro motivo que poderia induzir perfil indeterminado no WB poderia ser a soroconversão tardia, associado à baixa CPV e/ou infecção por provírus defectivo. Portanto, o fraco estímulo do sistema imunológico, interfere especialmente na resposta imune humoral com déficit de produção de anticorpos específicos (Cánepa et al., 2015). Soldan e colaboradores (1999) analisaram amostras de oito pacientes com doenças neurológicas, que apresentavam reatividade para HTLV-1/2 na triagem e WB indeterminado, e apenas 50,0% (n=4) deles tiveram PCR positiva. Os

autores levantaram a hipótese de se tratar de provírus defectivo. Um relato de soroconversão tardia foi observado na Alemanha, após transplante de órgãos sólidos (fígado, rim e coração), em que dois dos três receptores de um doador com HTLV-1, desenvolveram linfoma cutâneo dois e três anos após o transplante. A soroconversão no WB só ocorreu depois de seis anos, provavelmente em decorrência da terapia imunossupressora a que foram submetidos (Glowacka et al., 2013). Um grupo em Minas Gerais acompanhou uma coorte de 60 indivíduos de banco de sangue com WB indeterminado por oito anos; 12 destes apresentaram PCR positiva e a soroconversão demorou em média quatro anos (Martins et al., 2010). Assim sendo, recomenda-se realizar a análise molecular associada com os estudos de acompanhamento para determinar definitivamente o estado de infecção de indivíduos HTLV-1/2 indeterminado, de maneira especial as amostras com valores elevados de densidade óptica no EIA e/ou com reatividade para proteínas de *env* (rgp46 ou GD21) no WB. Neste contexto, as amostras com perfil indeterminado detectadas no presente estudo, poderiam indicar fase de soroconversão, uma vez que 77,8% das amostras com padrões indeterminados no WB apresentam reatividade para pelo menos uma banda correspondente a região de envelope (GD21, rgp46-I ou rgp46-II).

Outro teste *immunoblotting*, disponível para a confirmação e discriminação dos tipos virais de infecção por HTLV-1/2, é o LIA. Este ensaio ainda não é frequentemente utilizado, provavelmente pelo custo elevado do teste e/ou pela complexidade de interpretação das bandas presentes nas tiras durante a análise dos resultados.

Alguns estudos que utilizaram o LIA para esclarecer as amostras com padrão indeterminado no WB, observaram maior eficácia na confirmação ou exclusão da infecção por HTLV-1/2, e poucas amostras permaneceram inconclusivas. No presente estudo, o desempenho do LIA foi superior não apenas ao do WB, mas também em relação às PCR (qPCR e PCR-RFLP), quando aplicado como teste confirmatório. Das 14 (11,0%) amostras com perfil indeterminado: três foram confirmadas por WB ou PCR (2 HTLV-2 e 1 HTLV-1), e nove permaneceram inconclusivas (oito com reatividade apenas para gp21 I/II e uma positiva para combinação p19 I/II + p24 I/II). Sabino e colaboradores (1998) analisaram 292 amostras reagentes na triagem de bolsas de sangue em São Paulo, e o LIA solucionou 19 amostras com padrão indeterminado ou HTLV não tipado no WB. Na Suécia, o grupo de Thorstensson (2002) também observou maior sensibilidade do LIA na resolução de amostras com resultados WB indeterminados, e 91,0% foram consideradas como falso-positivas para infecção por HTLV.

Parece que os antígenos inseridos nas tiras de *nylon* são mais específicos para detectar anticorpos anti-HTLV, em especial HTLV-2 (Caterino-de-Araujo et al. 2015, e Campos et al., 2015), em função de baixos índices de perfis indeterminados decorrentes da avaliação feita por LIA, e nestes poucos casos, provavelmente por reagirem com as proteínas *gag* (p19 e p24) por meio de reação cruzada com os auto-anticorpos ou anticorpos de origem desconhecida (Zrein et al., 1998).

As reações qPCR (*pol*) e PCR-RFLP (*tax*) não apresentaram a sensibilidade esperada para um teste molecular, na população estudada. Os

resultados obtidos corroboram os de Costa (2010) e Costa et al. (2011), que encontraram dificuldades em amplificar os segmentos *pol* e *tax* em amostras de pacientes com HIV-1. No entanto, foi resolvido o diagnóstico de dois pacientes com perfil HTLV não tipado pelos ensaios confirmatórios sorológicos. Mesmo com alta sensibilidade de detecção, a qPCR no presente estudo resultou em 32 (31,0%) amostras “falso-negativas”, com divergência entre G1 e G2 [42,0% vs. 19,0%].

Os resultados obtidos com a PCR-RFLP de forma geral foram similares aos da qPCR, e especialmente quanto à sensibilidade não houve diferença significativa, o que mostra equivalência de detecção aplicada aos indivíduos HIV-1 positivos. Foram também solucionadas as amostras com perfil inconclusivo no WB e LIA [1 HTLV-1 e 2 HTLV-2], e o percentual de “falso negativo” foi de 30,6% [G1 (18,4%) e G2 (12,2%)]. Houve divergências em relação à especificidade, uma vez que a PCR-RFLP fez erroneamente a tipagem de três amostras como HTLV-1; e estas foram confirmadas como HTLV-2 em pelo menos outros dois ensaios confirmatórios. Este fato pode ser justificado pela ocorrência de mutações na sequência genômica de *tax* que alteraram o sítio ativo da enzima *Taq* I, impossibilitando-se a digestão enzimática e a formação de fragmentos característicos de HTLV-2, fato que poderá ser confirmado no futuro pelo sequenciamento deste segmento genômico. Tuke et al.(1992), que padronizaram o protocolo de PCR-RFLP, tampouco outros autores relataram problema semelhante, simplesmente por não ser comum a realização de tantos ensaios concomitantes para confirmar ou descartar a infecção por HTLV.

Andrade e colaboradores (2010) ao utilizarem a qPCR (*pol*) para detectar provírus HTLV-1 e HTLV-2 em população HTLV mono infectada, obtiveram sensibilidade e especificidade de 99,4% e 98,5%, respectivamente. O menor desempenho obtido nos ensaios moleculares aplicados à população co infectada por HIV-1 pode estar relacionado a flutuações de CPV decorrente da TARV, caracterizada por aumento de CPV nos três primeiros meses de uso de antivirais, e diminuição com um ano de terapia contínua (Machuca e Soriano 2000), ou a presença de provírus defectivo (Berini et al., 2008, Abran et al., 2011; Ueno et al., 2012 e Cánepa et al., 2015). De fato, no presente estudo, mais de 94,0% dos pacientes de G1 estavam em TARV e com CV de HIV-1 abaixo do limite de detecção por longo período (Caterino-de-Araujo et al., 2014, 2015; Campos et al., 2015). Entretanto, os pacientes de G2 tinham diagnóstico recente de infecção por HIV, porém não faziam o uso de TARV (dados não apresentados, porém obtidos do Sistema Nacional de Atendimento Médico (SINAM) e do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral. Isto justifica a diferença de resultados “falso-negativos” observada entre os grupos. Portanto, a falha na detecção de provírus de HTLV pode estar associada à TARV e/ou à presença de partículas provirais defectivas.

Não foi detectada qualquer correlação entre os resultados negativos das PCR com baixa contagem de células CD4+ e CD8+ (dados não apresentados). Curiosamente e em concordância com os dados de literatura, foram observados em G1, entre as poucas amostras com CV detectadas, os

maiores valores de CV HIV-1 nos espécimes sanguíneos de indivíduos com infecção por HTLV-1 e não por HTLV-2 ou por HTLV não tipado. E isto pode estar associado à evolução clínica do paciente, e sustenta a hipótese de que a coinfeção HIV-1/HTLV-2 desempenha um papel protetor no desenvolvimento da AIDS (Turci et al., 2006; Pilotti et al., 2007; Brites et al., 2009; Beilke., 2012).

Apesar da qPCR (*pol*) apresentar menor sensibilidade para detectar HTLV-2, no presente estudo não houve associação com sexo feminino (dados não apresentados), contrastando com os achados de Montanheiro et al. (2008) que encontraram associação entre menor CPV de HTLV-2 no sexo feminino em uma coorte de pacientes coinfectados HIV-1/HTLV-2 de São Paulo, e de Murphy et al. (2004) que encontraram além da menor CPV de HTLV-2 no sexo feminino também observaram maior CPV (*tax*) e a infecção por HTLV-2 subtipo A. Quanto às diferenças de CPV entre o tipo 1 e 2, e entre HTLV-2 subtipo A e subtipo B podem estar associadas às alterações na estrutura do gene e à expressão da proteína Tax que faz a distinção entre os tipos e subtipos de HTLV. Uma hipótese sobre a questão de as mulheres apresentarem CPV de HTLV-2 menor do que os homens pode ser o fato de elas adquirirem o HTLV-2 principalmente por via sexual, enquanto na maioria dos homens pode ter ocorrido pela via parenteral [UDI ou transfusão de sangue] (Murphy et al, 2004). De fato, no presente estudo em G1 a totalidade dos pacientes com a coinfeção HIV / HTLV relatou UDI ou sexo com UDI, enquanto em G2 a transmissão foi pela via sexual.

Parece também que a CPV de HTLV-1 está mais elevada nos indivíduos infectados por transfusão sanguínea. Este achado reforça as sugestões de que a via de infecção e/ou tempo de infecção são fatores determinantes para CPV. Ueno e colaboradores (2012) advertiram que os portadores de HTLV-1 que evoluíram para ATL, apresentavam CPV alta mesmo antes de eles desenvolverem a doença. Os portadores infectados pela via materna tendem a ter alta CPV; e isto explica a infecção perinatal como um dos fatores de risco para ATL. Outro fator comumente encontrado entre os portadores assintomáticos de HTLV-1 foi a presença de provírus defectivo ou com polimorfismo da região *gag*. As células infectadas por provírus defectivo podem não expressar certas proteínas de HTLV-1, que evitam o ataque de linfócitos T citotóxicos, e favorecem a imortalização das células infectadas.

Diante do desempenho dos testes de triagem e dos confirmatórios observados individualmente e combinados, fica evidente que principalmente na coinfeção, o melhor seria aliar a técnica de detecção de anticorpos específicos com a pesquisa de segmentos do genoma viral, na tentativa de suprir as falhas dos ensaios já descritas em literatura (Caterino-de-Araujo et al., 1998; 2014; 2015; Jacob et al., 2007; 2008a; 2008b; Costa et al., 2011 e Campos et al., 2015). Desta forma, o algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 a ser aplicado na análise das amostras de indivíduos HIV-1 positivos, pode variar de acordo com a infraestrutura física e as condições financeiras do laboratório.

Priorizando-se o custo-efetividade, o algoritmo poderia contar com um EIA na triagem; desde que sejam consideradas as amostras com valores na zona cinza. Enquanto a etapa de confirmação é feita pelo ensaio de qPCR (*poI*) como primeira escolha, as amostras negativas são analisadas pelo LIA (**Figura 12 e Tabela 9**). Este algoritmo de testes laboratoriais (Algoritmo D) (**Tabela 9**) reduziria os custos dos testes confirmatórios para infecção por HTLV-1/2 em 25,0% quando comparado com o atualmente utilizado (WB ensaio de primeira escolha, seguido da qPCR) e, ainda, solucionaria 98,1% (106/108) de todas as amostras consideradas positivas.

A implantação do Algoritmo H (LIA + PCR-RFLP) (**Tabela 9**) apresentaria redução de 52,7% dos gastos com os testes confirmatórios e haveria apenas uma amostra inconclusiva (1/108). Todavia, o ensaio de PCR-RFLP apresenta vários problemas, pois além das três amostras tipadas erroneamente, a técnica requer infraestrutura com áreas separadas para efetuar a manipulação de produtos pré- e pós-amplificação (sala limpa, de aplicação e de amplificação). Exige, também, recurso humano especializado para executar o ensaio de maneira adequada para evitar contaminação cruzada, pois a manipulação é excessiva e inevitável. Outra desvantagem desta metodologia é não ser passível de automação, diferentemente da técnica de qPCR, que também demanda infraestrutura semelhante, porém possibilita efetuar automação e realização em grande escala, com baixo risco de contaminação, por utilizar sistema fechado para quantificação.

Na impossibilidade de combinar os ensaios confirmatórios, recomenda-se utilizar o LIA (**Figura 13**), uma vez que ele mostrou melhor

desempenho isoladamente na confirmação e discriminação da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos HIV-1 positivos, além de dispensar equipamentos caros, e necessita apenas de plataforma orbital e compressor a vácuo. A única dificuldade reside na leitura das tiras e na análise dos resultados, pela subjetividade na interpretação de bandas reativas, de acordo com a intensidade de cor produzida. No entanto, sua eficácia justifica o acréscimo de 8,7% dos custos em relação ao WB, uma vez que apenas três amostras continuaram inconclusivas.

A prevalência da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos HIV-1 positivos corrobora os dados obtidos em anos anteriores em amostras encaminhadas ao IAL de São Paulo, e confirma a diminuição de ocorrência desta coinfeção com o passar dos anos (Araujo et al., 1994; Caterino-de-Araujo et al., 1998, 2006, 2010; Caterino-de-Araujo e Santos-Fortuna 1999; Casseb et al., 1997; Morimoto et al., 2005, 2007; Jacob et al., 2007, 2008a). Das 2.991 amostras analisadas, 108 confirmaram a infecção HTLV-1 e/ou HTLV-2, amostras estas provenientes dos dois modelos de SAE. Portanto, foram detectados 3,6% de coinfeção HIV-1/HTLV, e no serviço pioneiro prevalência foi de 3,1% (Caterino-de-Araujo et al., 2014, 2015 e Campos et al., 2015). No SAE com histórico mais recente, prevalência de coinfeção HIV-1/HTLV foi de 4,2%, sem diferença estatística.

A baixa prevalência de coinfeção HIV/HTLV encontrada pode estar associada à introdução da política de redução de danos no estado de São Paulo iniciada em Santos em 1989 (Lei Estadual 9758, de 17/3/1997 e Decreto Estadual 42927, de 13/3/1998), bem como as mudanças nas

características epidemiológicas da população exposta ao HIV e ao tipo de drogas ilícitas utilizadas na atualidade (troca da cocaína injetável pelo crack).

Quanto à categoria de exposição aos retrovírus, G1 foi associado à UDI direta e indiretamente, seja pelo compartilhamento de seringas e agulhas ou por ser parceiro sexual de UDI, uma vez que a maioria deste grupo relatou envolvimento com UDI, e de adquirir a infecção pelo HIV na década de 90, anterior a política de redução de danos (Caterino-de-Araujo et al., 2015). Enquanto G2 aparenta ter tido exposição ao risco sexual, decorrente de promiscuidade, e com histórico de aquisição recente da infecção por HIV-1 (dados não apresentados).

Apesar de a população estudada ser composta na maioria por indivíduos do sexo masculino, quando foram analisados ambos os grupos coinfectados apresentaram diferença estatística e associação positiva entre a infecção HTLV-1/2 e os pacientes do sexo feminino. Estes achados concordam com os descritos por Jacob et al. (2008) em população de risco (HIV e com sintomas associados à infecção por HTLV-1) de São Paulo e por Ishak e colaboradores (1995, 2003) na Região Amazônica. Contudo, Schechter et al. (1994) relataram a associação dos pacientes do sexo masculino com a infecção por HTLV-1/2 em pacientes HIV positivos do Rio de Janeiro, assim como nos estudos realizados por Etzel et al. (2001) em Santos, Morimoto et al. (2005) no Paraná, Barcelos et al. (2006) no Sul do Brasil e de-Oliveira (2012) no Piauí. Há que se levar em conta que esses estudos foram conduzidos em momentos distintos e com populações de diferentes regiões e números de pacientes analisados.

Relatam-se algumas hipóteses para justificar o risco apresentado pelo sexo feminino em adquirir a infecção por HTLV-1/2. Um deles é referente ao fato da transmissão do homem para a mulher ser mais efetiva, e ainda ser acrescida pelo histórico de outras doenças sexualmente transmissíveis recorrentes que provocam lesões na mucosa, principalmente vaginal e/ou recrutamento de infiltrado inflamatório. Esta condição aumenta o número de linfócitos *in situ*, que elevam as chances de transmissão por meio de contato célula a célula (Paiva e Casseb, 2014). Foi também comprovado que a CPV encontrada em indivíduos que adquiriram a infecção por via sexual era mais baixa em relação aos portadores que se infectaram pela via vertical e parenteral (Roucoux et al., 2005, Paiva e Casseb, 2014). Em vista da via sexual proporcionar exposição com menor número de células infectadas, é possível que sejam necessárias repetidas exposições para efetivar a infecção, o que justificaria o aumento de risco com o avançar da idade (Proietti e Carneiro-Proietti 2010 e de-Oliveira et al. 2012).

No presente trabalho, houve diferença na faixa etária dos indivíduos infectados pelo HIV-1 analisados, os quais eram atendidos em dois modelos de SAE de São Paulo (G1 44 anos vs. G2 36 anos), provavelmente em decorrência de G1 ter sido o primeiro Centro de Referência em HIV da capital e, portanto, por atender pacientes mais antigos, enquanto os outros serviços de São Paulo são mais novos e atendem população mais jovem, com histórico de infecção recente por HIV-1. Todavia, a média de idade apresentada pelos coinfectados de ambos os grupos foi maior que 40 anos,

porém com diferença estatisticamente significativa (G1 49,5 anos vs. G2 43,5 anos).

Em G1, foi também possível fazer associações de infecção pelos HTLV com a cor negra/parda e com a infecção pelo HCV e HBV, confirmando-se os dados no Brasil descritos na literatura (Caterino-de-Araujo et al., 2015; Brites et al., 2001, 2009; Dourado et al., 1999; Etzel et al., 2001).

Em conclusão, os resultados obtidos tornam evidente a necessidade de realizar a vigilância de HTLV-1/2 em população infectada pelo HIV-1 de São Paulo, com o intuito de compreender a dinâmica de sua disseminação, buscar testes laboratoriais mais adequados ao diagnóstico e o melhor algoritmo de custo-efetividade. Na qualidade de Laboratório de Referência em HTLV, o Instituto Adolfo Lutz tem um novo desafio: pesquisar mutações pontuais e partículas provirais defectivas em indivíduos coinfectados HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2, com vistas a justificar os resultados discordantes e falso-negativos obtidos nos testes moleculares.

## 6. Conclusões

Observou-se que o algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 em indivíduos infectados por HIV-1, pode contar com apenas um EIA na triagem, desde que considere a zona cinza como critério para seguir para a etapa de confirmação.

Quanto à etapa confirmatória, nenhum teste conseguiu sozinho detectar todas as amostras positivas, assim é necessário realizar um ensaio complementar. A combinação de testes de melhor custo-benefício consiste em realizar um teste molecular [qPCR (*pol*)] seguido de um sorológico [LIA]. Porém, para seguir este algoritmo é imprescindível que o laboratório disponha de estrutura física específica para desenvolver biologia molecular. Em situações que inviabilize a combinação de ensaios, o LIA é a melhor escolha, pela sua eficácia e por dispensar infraestrutura complexa para sua implantação e execução.

Analisando-se os resultados obtidos de amostras de pacientes atendidos nos dois modelos de SAE de São Paulo, confirmou-se a diminuição na prevalência da infecção por HTLV (3,6%) ao longo dos anos. Houve equivalência entre ambas coinfeções HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2, que apresentaram associação com o sexo feminino e idade a partir da quarta década de vida.

## 7. Referências Bibliográficas

Abrams A, Akahata Y, Jacobson S. The prevalence and significance of HTLV-I/II seroindeterminate Western blot patterns. *Viruses*. 2011; 3(8):1320-31.

Alcântara LC, Shindo N, Costa MCR, Kashima S, Van Dooren S, Salemi M, et al. Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. *AIDS Res Hum Retrov*. 2003; 19:519-23.

Andersson S, Thorstensson R, Godoy Ramirez K, Krook A, Sydow M von, Dias F, Biberfeld G. Comparative evaluation of 14 immunoassays for the detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion*. 1999; 39:845-51.

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.

Araujo A, Sheehy N, Takahashi H, Hall WW. Concomitant infections with human immunodeficiency virus type 1 and human T-lymphotropic virus types

1 and 2. In: Polymicrobial Diseases. Brogden KA and Guthmiller JM, eds. ASM Press, Washington, DC, 2002.

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.

Bangham CR, Cook LB, Melamed A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin Cancer Biol.* 2014; 26:89-98.

Bangham CR. HTLV-1 clonality: dissemination and persistence. *R. Ci. Méd. PE.* 2011; 7(2):130.

Banki K, Maceda J, Hurley E, Ablonczy E, Mattson DH, Szegedy L, Hung C, Perl A. Human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-related endogenous sequence, HRES-1, encodes a 28-kDa protein: A possible autoantigen for HTLV-I gag-reactive autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89:1939-43.

Barcellos NT, Fuchs SC, Mondini LG, and Murphy EL: Human T lymphotropic virus type I/II infection: Prevalence and risk factors in individuals testing for HIV in counseling centers from Southern Brazil. *Sex Transm Dis.* 2006; 33:302-6.

Barreto-Damião CH, Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Magri MC, Alencar WK, Caterino-de-Araujo A. Comparação de dois ensaios imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 em população infectada pelo HIV. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2014; 24(1):26-8.

Beilke MA, Theall KP, O'Brien M, et al.: Clinical outcomes and disease progression among patients coinfecting with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. *Clin Infect Dis*. 2004; 39:256-63.

Beilke MA. Retroviral coinfections HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2012; 28(2):139-47.

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.

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.

Bezerra ACS et al. 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.

Borducchi DMM, Kerbauy J, DE Oliveira JSR. Linfoma/Leucemia de células T do adulto. Rev Assoc Med Bras. 1999; 45(1):63-70.

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. 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. Portaria nº 34, de jul. 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 29 de jul. 2005. Procedimentos sequenciados 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].

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

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, Harrington W Jr, Pedroso C, Netto EM, and Badaró R: Epidemiological characteristics of HTLV-I and II coinfection in Brazilian subjects infected by HIV-1. *Braz J Infect Dis*. 1997; 1:42–7.

Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV/Human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS*. 2009; 11:8-16.

Campos KR, Dall’Agnol UAG, Costa EAS, Caterino-de-Araujo A. Serum samples collection with discordant results on enzyme immunoassays for detecting HTLV-1 and HTLV-2 specific antibodies. XI Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, Olinda, Recife, PE. In: *R Ci Méd PE*. 2011; 7(2):37.

Campos KR, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Costa NA, Barreto-Damião CH, Magri MC et al. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e

tipo 2 (HTL V-2) em pacientes infectados por HIV-1. Rev Inst Adolfo Lutz. 2015; 74(1):57-65.

Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, Biglione M. Low proviral load is associated with indeterminate Western Blot patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus type 1 infected individuals: Could punctual mutations be related? Viruses. 2015; 7(11):5643-58.

Cann A.J., Chen I.S.Y. Human T-cell leukemia virus type I and II. In: Fields Virology. Lippincott-Raven, New York.1996; 1849–1880.

Carneiro-Proietti AB, Sabino EC, Leão S, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 and type 2 seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009. AIDS Res Hum Retrovir. 2012; 28:1265-72.

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.

Carneiro-Proietti ABF. HTLV Cadernos Hemominas. Fundação Hemominas, Minas Gerais. 2010. Volume XV. 392p.

Carvalho MMN, Novaes AE, Marcelino De Carvalho E, Araújo MI. Doenças reumáticas auto-ímmunes em indivíduos infectados pelo HTLV-1. *Rev Bras Reumatol.* 2006; 46(5):334-9.

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.* 1997; 39(4):213-5.

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.

Catalan-Soares BC, Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000). Aspectos epidemiológicos. *Rev Bras Epidemiol.* 2001; 4(2):81-95.

Caterino-de-Araujo A, Favero A., Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L, Calabrò ML. HTLV-1/HTLV-2 coinfection in AIDS patient from São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2010; 16(8):715-9.

Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Costa EAS, Manuel RCR. HTLV-1 infection in a patient with arthritis in Mozambique: molecular characterization of HTLV-1 isolate. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2011; 27(12):1255-7.

Caterino-de-Araujo A, Sacchi CT, Gonçalves MG, Campos KR, Magri MC, Alencar WK et al. Current prevalence and risk factors associated with Human T Lymphotropic Virus type 1 and Human T Lymphotropic Virus type 2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2015; 31(5):543-9.

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Magri MC, Schuelter-Trevisol F, Silva MV. Unpredicted HTLV-1 infection in female sex worker from Imbituba, Santa Catarina. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006; 48(4):237-8.

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Zandoná-Meleiro MC, Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. 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*. 1998; 30(3):173-82.

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E. No evidence of vertical transmission of HTLV-I and HTLV-II in children at high risk for HIV-1 infection from São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatrics*. 1999; 45:42-7.

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.

Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico sorológico e molecular do HTLV-1 e HTLV-2. Experiência de um Laboratório de Saúde Pública do Brasil. *R Ci Méd PE*. 2011; 7(2):123-7.

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.

Césaire R, Kerob-Bauchet B, Bourdonne O, et al. Evaluation of HTLV-I removal by filtration of blood cell components in a routine setting. *Transfusion*. 2004; 44:42-8.

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. 2009; 68(2):148-51.

Costa EAS, Magri MC, Caterino-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. J Virol Methods. 2011; 173:280-3.

Costa EAS. 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]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2010. 101pp.

Costa JMP, Costa EAS, Segurado AAC. Infecção por HTLV-I e HTLV-II. In: Ferreira AW, Moraes SL. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p.120-34.

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.

Costa JMP. Padronização e emprego de métodos de amplificação molecular para pesquisa de sequências 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.

Davidson F, Lycett C, Jarvis LM, et al. Detection of HTLV-I and II in Scottish blood donor samples and archive donations. *Vox Sang*. 2006; 91:231-6.

de Oliveira EH, Oliveira-Filho AB, Souza LA, Silva LV, Ishak MOG, Ishak R, Vallinoto ACR. Human T-cell lymphotropic virus in patients infected with HIV-1: Molecular epidemiology and risk factors for transmission in Piauí, Northeastern Brazil. *Curr HIV Res*. 2012;10:700–7.

De-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol*. 1994; 10:165-71.

Dehée A, Césaire R, Désire N, Lézin A, Boudonné O, Béra O, et al. Quantitation of HTLV-1 proviral load by TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2002; 102:37-51.

Dezzutti CS and Lal RB: Human T-cell lymphotropic virus types I and II. In: *Manual of Clinical Microbiology* (Murray PR, Baron KJ, Pfaller MA, et al., eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1999; p. 871.

Dhasmana D, Taylor GP. Human T-lymphotropic virus/HIV co-infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2014; 27(1):16-28.

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, Rio de Janeiro.* 1999; 94:13-8.

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, et al. 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.

Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Souza Júnior VG, Botelho CA, Duarte G. Infecção pelo vírus linfotrófico 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.

Filippone C, Bassot S, Betsem E, Tortevoeye P, Guillotte M, Mercereau-Puijalon O, Plancoulaine S, Calattini S, Gessain A. A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern:

Epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50:1663-72.

Galetto LR, Lunge VR, Béria JU, Tietzmann DC, Stein AT, Simon D. Short communication: Prevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus infection in Southern Brazilian HIV-positive patients. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2014; 30(9):907-11.

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.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Marus L, Calender A, The G. Antibodies to human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985; 2:407-10.

Gessain A e Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012; 3:388.

Glowacka I, Korn K, Potthoff SA, Lehmann U, Kreipe HH, Ivens K, Barg-Hock H, Schulz TF, Heim A. Delayed seroconversion and rapid onset of lymphoproliferative disease after transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 from a multiorgan donor. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(10):1417-24.

Governo do Estado de São Paulo. Lei Estadual nº 9758 de 17/09/97. Dispõe sobre a autorização da Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo a distribuir seringas descartáveis a usuários de drogas injetáveis. Diário Oficial do Estado, São Paulo, 18 set. 1997. Seção I. Vol.107. N.179. p.1.

Governo do Estado de São Paulo. Decreto Estadual nº 42927 de 13/03/98. Dispõe sobre a autorização da Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo a adquirir e distribuir seringas descartáveis com o objetivo de prevenir, controlar e reduzir a transmissão do vírus da AIDS entre usuários de drogas injetáveis. Diário Oficial do Estado, São Paulo, 14 mar. 1998. Seção I. Vol.108. N.50. p.1.

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.

Hewitt PE, Davison K, Howell DR, et al. Human T lymphotropic virus look back in NHS blood and transplant (England) reveals the efficacy of leukoreduction. Transfusion. 2013; 53:2168-75.

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

Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Ishak MOG. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2003; 19(4):901-14.

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.

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. 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.

Jones KS, Fugo K, Petrow-Sadowski C, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol.* 2006; 80:8291-302.

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.

Kawamura T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. *Arq Bras Cardiol.* 2002; 79 (4):437-41.

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.

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.

Lal RB, Rudolph DL, Coligan JE, Brodine SK, Roberts CR. Failure to detect evidence of human T-lymphotropic virus (HTLV )type I and type II in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV I/II. *Blood.* 1992; 80:544–50.

Laperche S, Worms B, Pillonel J, et al. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox Sang.* 2009; 96:104-10.

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.

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.

Lu SC e Chen BH. Seroindefinite HTLV-1 prevalence and characteristics in blood donors in Taiwan. *Int J Hematol.* 2003; 77:412-3.

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<sup>1</sup>, Brigido LF, Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A. Human T cell lymphotropic virus type 2a strains among HIV type 1-coinfected patients from Brazil have originated mostly from Brazilian Amerindians. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2013; 29(7):1010-8.

Mahieux R, Horal P, Maucière P, Mercereau-Pujjalon O, Guillote 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.

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.

Marano G, Vaglio S, Pupella S, Facco G, Catalano L, Piccinini V, Liunbruno GM, Grazzini G. Human T-lymphotropic virus and transfusion safety: does one size fit all? *Transfusion*. 2016; 56(1):249-60.

Martins ML, Santos AC, Namen-Lopes MS, Barbosa-Stancioli EF, Utsch DG, Carneiro-Proietti AB. Long-term serological follow up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. *J Med Virol*. 2010; 82:1746-53.

Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*. 2009; 6:71.

Melamed A, Witkover AD, Laydon DJ, Brown R, Ladell K, Miners K, Rowan AG, Gormley N, Price DA, Taylor GP et al.: Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog*. 2014; 10(3): e1004006.

Ministério da Saúde (BR). 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. 54p. : II. (Série TELELAB).

Montanheiro P, Olah I, Fukumori LM, Smid J, Oliveira AC, Kanzaki LI, Fonseca LA, Duarte AJ, Casseb J. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res*. 2008; 135(1):22-5.

Moreira ED Jr, Ribeiro TT, Swanson P, et al.: Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993; 6:959–63.

Moreno C, Balangero M, Barbás MG, Cudolá A, Gallego S. Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir el estatus serológico en donantes de sangre. *Rev Argent Microbiol*. 2013; 45(3):165-8.

Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Stegmann JW, Reiche FV. 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(4):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.

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.

Nasir IA, Ahmad AE, Emeribe AU, Shehu MS, Medugu JT, Babayo A. Molecular detection and clinical implications of HTLV-1 infections among antiretroviral therapy-naïve HIV-1-infected individuals in Abuja, Nigeria. *Virology*. 2015; 6:17-23.

Oliveira P, Castro NM, Muniz AL, Tanajura D, Brandão JC, Porto AF, Carvalho EM. Prevalence of erectile dysfunction in HTLV-1-infected patients and its association with overactive bladder. *Urology*. 2010; 75(5):1100-3.

Paiva A and Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014; 47(3):265-274.

Picker SM. Current methods for the reduction of bloodborne pathogens: a comprehensive literature review. *Blood Transf*. 2013; 11:343-8.

Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, Bertazzoni U, Re MC, Allibardi S. Post genomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood*. 2007; 109(5):1850-6.

Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol.* 2012; 3:378.

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.

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.

Pomier C, Rabaoui S, Pouliquen JF, Couppié P, El Guedj M, Nacher M, Lacoste V, Wattel E, Kazanji M, Mortreux F. Antiretroviral therapy promotes an inflammatory-like pattern of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) replication in human immunodeficiency virus type 1/HTLV-1 co-infected individuals. *J Gen Virol.* 2013; 94(4):753-7.

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 AF, Carneiro-Proietti ABF. HTLV in the Americas. *Rev Panam Salud Publica*. 2006; 19(1):6-8.

Rego F, Mota-Miranda A, Santos E, et al. Seroprevalence and molecular epidemiology study of the HTLV-1 isolates from HIV-1 coinfecting women in Feira de Santana, Bahia, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2009; 25:1278-9.

Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, Newman B, Lee TH, Chafets DM, Murphy EL. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis*. 2005; 191(9):1490-7.

Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*. 2004; 6:144-54.

Rouet F, Meertens L, Courouble G, Hermann-Storck C, Pabingui R, Chancerel B, Abid A, Strobel M, Mauclore P, Gessain A. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1247-53.

Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Gribeiro-dos-Santos G, Sáez-Alquézar 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; 37:1324-8.

Santos FLN, Lima FWM. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. *J Bras Patol Med Lab.* 2005; 41(2):105-116.

Santos TJ, Costa CM, Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J, Van Doren S, Mota RM, de Castro Costa FB, Oliveira AC, Barreto V, Gomes AF, Carneiro-Proietti AB, de Bruin VM, de Sousa FC, Oria RB. Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus I/II (HTLV-I/II) in Fortaleza (Brazil): A serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7:202-9.

Sato A, Isaka Y, Morita F, Ishii A., Goto Y, Imai J, Igarashi H, Yoshie O, Hinuma Y. Human sera from varicella-zoster virus (VZV) infections cross-react with human T cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1): common epitopes in VZV gene 22 protein and HTLV-1 p19 gag protein. *J Gen Virol.* 1992; 73(11):2969-73.

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 Hematol.* 2010; 50(1):1-8.

Schechter M, Harrison LH, Halsey NA, et al. Coinfection with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV in Brazil. Impact on markers of HIV disease progression. *J Am Med Assoc.* 1994; 271(5):392-3.

Schüpbach J, Kalyanaraman VS. Detection of high concentrations of HTLV-1 p24 and a novel gag precursor, p45, in serum immune complexes of a healthy seropositive individual. *Int J Cancer.* 1989; 44(1):90-4.

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; 80:3618-22.

Shindo N, Alcantara LC, Van Dooren S, Salemi M, Costa MC, Kashima S, et al. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2002; 18:71-7.

Sobata R, Matsumoto C, Uchida S, et al. Estimation of the infectious viral load required for transfusion-transmitted human T-lymphotropic virus type 1 infection (TT-HTLV-1) and of the effectiveness of leukocyte reduction in preventing TT-HTLV-1. *Vox Sang.* 2015; 109:122-8.

Soldan SS, Graf MD, Waziri A, Flerlage AN, Robinson SM, Kawanishi T, Leist TP, Lehky TJ, Levin MC, Jacobson S. HTLV-I/II seroindeterminate

Western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. *J Infect Dis.* 1999; 180:685-94.

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.

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

Travassos AG, Brites C, Netto EM, Fernandes S de A, Rutherford GW, and Queiroz CM: Prevalence of sexually transmitted infections among HIV-infected women in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012; 16:581-5.

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, 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.

Tynell E, Andersson S, Lithander E, et al. Screening for human T-cell leukaemia/lymphoma virus among blood donors in Sweden: cost effectiveness analysis. *BMJ*.1998; 316:1417-22.

Ueno S, Umeki K, Takajo I, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K, Morishita K, Okayama A. Proviral loads of human T-lymphotropic virus Type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer*. 2012; 130(10):2318-26.

Vallinoto ACR, Azevedo VN, Santos DEM, Caniceiro S, Mesquita FCL, Hall WW, Ishak MOG, Ishak R. Serological evidence of HTLV-I and HTLV-II coinfections in HIV-1 positive patients in Belém, State of Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 1998; 93(3): 407-9.

Vallinoto ACR, Pontes GS, Muto NA, Lopes IGL, Machado LFA, Azevedo VN, Carvalhaes FAPL, Santos SEB, Guerreiro JF, Ishak MOG, Ishak R. 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, Rio de Janeiro*. 2006; 101(1):103-5.

Vandamme AM, Van Laethem K, Liu H-F, et al. Use of a generic polymerase chain reaction assay detecting human T-lymphotropic virus (HTLV) types I, II and divergent simian strains in the evaluation of individuals with indeterminate HTLV serology. *J Med Virol*. 1997; 52:1-7.

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.

Verdonck K, González E, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient. *Lancet Infect Dis.* 2007; 4:266-81.

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.

Vo MT, Bruhn R, Kaidarova Z, Custer BS, Murphy EL, Bloch EM. A retrospective analysis of false-positive infectious screening results in blood donors. *Transfusion.* 2016; 56(2):457-65.

Vrieling 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.

Waziri A, Soldan SS, Graf MD, Nagle J, Jacobson S. Characterization and sequencing of prototypic human T-lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1) from an HTLV-1/2 seroindeterminate patient. *J Virol.* 2000; 74:2178-85.

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

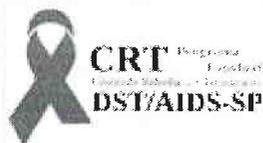
Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79:2031-5.

Zanjani DS, Shahabi M, Talaei N, Afzalaghaee M, Tehranian F, Bazargani R. Molecular analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1/2) seroindeterminate blood donors from Northeast Iran: Evidence of proviral tax, env, and gag sequences. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2011; 27:131-5.

Zehender G, Colasante C, Santambrogio S, et al. Increased risk of developing peripheral neuropathy in patients coinfecting with HIV-1 and HTLV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002; 31:440-7.

Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G, Bosman F, Sablon E, Demarquilly C, Boniface M, Saman E. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998; 5:45-9.

## 8.1. Aprovação CEP – CRT



### CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV

**Pesquisador:** Adele Caterino de Araujo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 11302512.0.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))  
Instituto Adolfo Lutz  
Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 201.697

**Data da Relatoria:** 18/02/2013

#### Apresentação do Projeto:

O projeto avaliará pacientes com HIV/Aids atendidos no CRT-DST/Aids de São Paulo. Determinará a taxa de co-infecção HIV/HTLV-1/2 e o desempenho dos testes confirmatórios imunocromatográfico e PCR em tempo real no diagnóstico do HTLV, assim como serão realizadas a caracterização molecular dos vírus e a avaliação do papel das células T reguladoras na co-infecção.

#### Objetivo da Pesquisa:

Conhecer a prevalência da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes soropositivos para o HIV em serviço especializado do Estado de São Paulo. Pesquisar marcadores imunológicos e virológicos de valor diagnóstico e prognóstico na co-infecção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2.

Contribuir para o desenvolvimento da vigilância desse agravo na população. Identificar o melhor teste confirmatório de infecção por HTLV-1/2 na co-infecção com o HIV. Detectar possíveis flutuações de carga proviral de HTLV na co-infecção. Caracterizar cepas de HIV e HTLV-1/2 nos co-infectados. Avaliar o número e entender a função das células T reguladoras na co-infecção. Correlacionar os resultados obtidos com variáveis sócio-econômicas, clínicas e laboratoriais usando ferramentas de estatística e de Bioinformática.

**Endereço:** SANTA CRUZ 1/981

**Bairro:** VILA MARIANA

**UF:** SP

**Telefone:** (11)5087-9837

**Município:** SAO PAULO

**Fax:** (11)5087-9837

**CEP:** 04.121-000

**E-mail:** cep@crt.saude.sp.gov.br



## CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS



### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O estudo não implica em risco adicional aos pacientes, uma vez que as coletas das amostras de sangue para a pesquisa serão feitas durante a mesma punção venosa utilizada para a coleta de células CD4 e aferição da carga viral. O projeto trará benefícios para a saúde pública por gerar conhecimento sobre a epidemiologia e a biologia da infecção pelo HTLV em portadores de HIV/AIDS, assim como por definir o melhor teste confirmatório do HTLV a ser usado nesta população.

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente estudo apresenta relevância do ponto de vista da saúde pública, pois fornecerá informações sobre a prevalência, epidemiologia e comportamento biológico da infecção por HTLV-1 e 2 em pacientes portadores de HIV/AIDS. Esses vírus causam infecção crônica no hospedeiro e podem interferir com o início do tratamento antiretroviral e com a evolução para AIDS, além de poderem causar doenças hematológicas e neurológicas graves, justificando a importância de se melhorar seu diagnóstico e conhecer suas interações com o organismo afetado.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termo de parceria/ colaboração apresentado

### **Recomendações:**

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há impedimento ético para a realização do projeto.

### **Situação do Parecer:**

Aprovado

### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** SANTA CRUZ 1/981

**Bairro:** VILA MARIANA

**UF:** SP

**Telefone:** (11)5087-9837

**Município:** SAO PAULO

**Fax:** (11)5087-9837

**CEP:** 04.121-000

**E-mail:** cep@crt.saude.sp.gov.br



## CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS



SAO PAULO, 21 de Fevereiro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Eduardo Ronner Lagonegro**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** SANTA CRUZ 1/981

**Bairro:** VILA MARIANA

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 04.121-000

**Telefone:** (11)5087-9837

**Fax:** (11)5087-9837

**E-mail:** cep@crt.saude.sp.gov.br

## 8.2. Aprovação CEPIAL

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV

**Pesquisador:** Adele Caterino de Araujo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 11302512.0.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 187.709

**Data da Relatoria:** 17/01/2013

#### Apresentação do Projeto:

O presente projeto irá avaliar indivíduos infectados pelo HIV/Aids atendidos no Centro de Referência e Treinamento DST/ Aids (CRT-DST/Aids) de São Paulo. Serão determinados a taxa de co-infecção HIV/HTLV-1/2 e o desempenho dos testes confirmatórios imunocromatográfico e de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real no diagnóstico do HTLV e serão realizadas a caracterização molecular do HTLV-1, HTLV-2 e do HIV e a avaliação do papel das células T reguladoras na co-infecção.

#### Objetivo da Pesquisa:

Conhecer a prevalência da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes soropositivos para o HIV em serviço especializado do Estado de São Paulo. Pesquisar marcadores imunológicos e virológicos de valor diagnóstico e prognóstico na co-infecção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2.

Contribuir para o desenvolvimento da vigilância desse agravo na população. Identificar o melhor teste confirmatório de infecção por HTLV-1/2 na co-infecção com o HIV. Detectar possíveis flutuações de carga proviral de HTLV na co-infecção. Caracterizar cepas de HIV e HTLV-1/2 nos co-infectados. Avaliar o número e entender a função das células T reguladoras na co-infecção. Correlacionar os resultados obtidos com variáveis sócio-econômicas, clínicas e laboratoriais usando ferramentas de estatística e de Bioinformática.

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 2º andar - Sala 73

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

*Handwritten signature*

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O estudo não implica em risco adicional aos pacientes, uma vez que as coletas das amostras de sangue para a pesquisa serão feitas durante a mesma punção venosa utilizada para a coleta de células CD4 e aferição da carga viral. O projeto trará benefícios para a saúde pública por gerar conhecimento sobre a epidemiologia e a biologia da infecção pelo HTLV em portadores de HIV/AIDS, assim como por definir o melhor teste confirmatório do HTLV a ser usado nesta população.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente estudo apresenta relevância do ponto de vista da saúde pública, pois fornecerá informações sobre a prevalência, epidemiologia e comportamento biológico da infecção por HTLV-1 e 2 em pacientes portadores de HIV/AIDS. Esses vírus causam infecção crônica no hospedeiro e podem interferir com o início do tratamento antiretroviral e com a evolução para AIDS, além de poderem causar doenças hematológicas e neurológicas graves, justificando a importância de se melhorar seu diagnóstico e conhecer suas interações com o organismo afetado.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto: encontra-se adequadamente preenchida e contém os dados da entidade financiadora principal (FAPESP). Descrição da pesquisa: a exposição dos objetivos, metodologia e critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos está clara e adequada. Informações relativas aos sujeitos da pesquisa: foi informado no item outras informações que poderão ser contratados terceiros para atuar como entrevistadores. É necessário haver garantia do sigilo por parte dos mesmos. TCLE: está redigido de maneira compreensível e contém os itens necessários conforme a resolução 196/96, além de esclarecer ao paciente que o material colhido será utilizado apenas no presente estudo e que no caso de utilização para outros fins, novo termo de consentimento deverá ser obtido. Termo de compromisso dos pesquisadores em cumprir as exigências da resolução 196/96: não consta o do participante Luis Fernando Brigido.

**Recomendações:**

Incluir termo de compromisso que garanta o sigilo dos dados relativos aos pacientes por parte da equipe terceirizada que poderá ser contratada para entrevistar os mesmos. Acrescentar o termo de compromisso do participante Luis Fernando Brigido com as exigências da resolução 196/96.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O presente estudo apresenta relevância para a saúde pública na medida em que fornecerá informações sobre a epidemiologia da infecção pelo vírus HTLV nos portadores de HIV/AIDS e as interações entre esses vírus no hospedeiro, além de auxiliar na definição do melhor teste diagnóstico confirmatório da infecção pelo HTLV nos portadores de HIV/AIDS. Observadas as recomendações supracitadas, não foram detectadas inadequações que acarretem pendências,

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 2º andar - Sala 73

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

estando o projeto aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

SAO PAULO, 22 de Janeiro de 2013



Assinador por:  
**Luz Marina Trujillo**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Dr. Arnaldo 355 - 2º andar - Sala 73

**Bairro:** Cerqueira César

**CEP:** 01.246-902

**UF:** SP

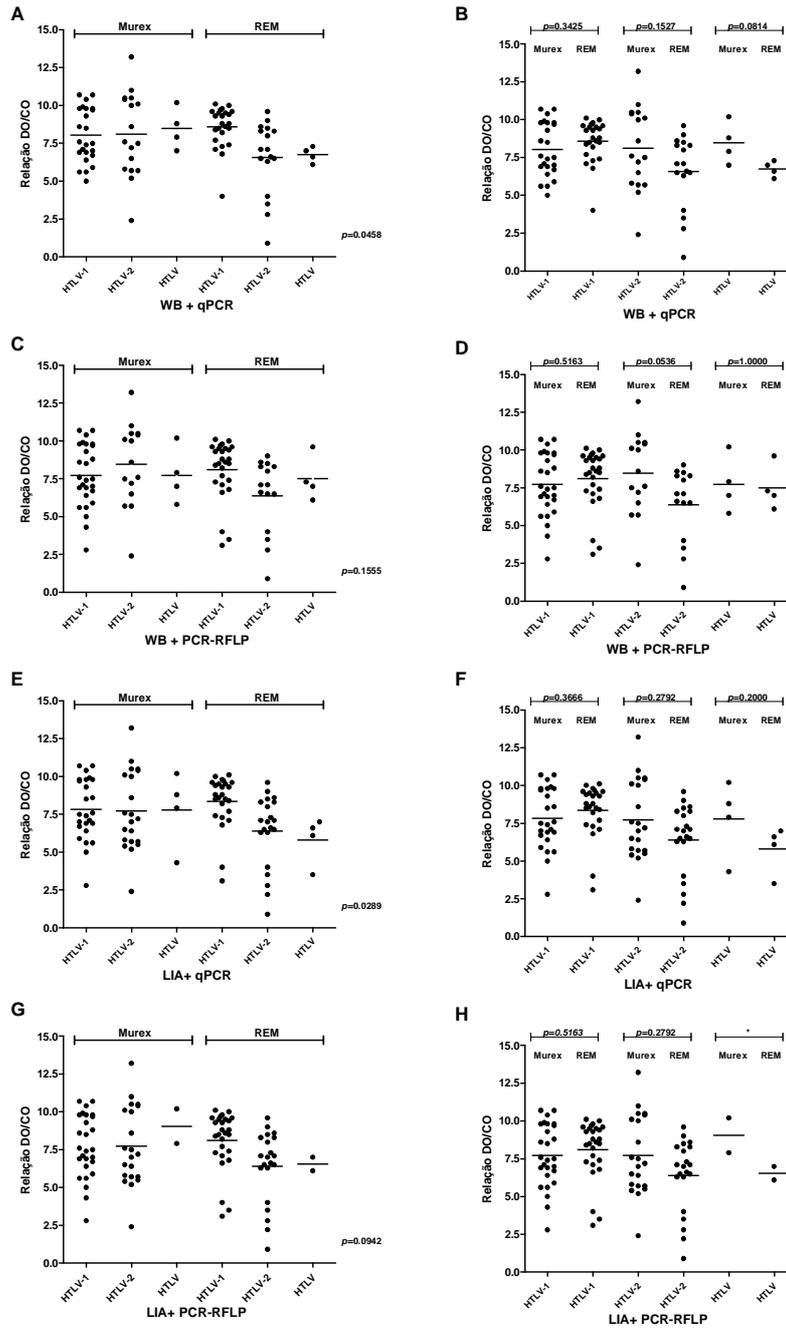
**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3068-2859

**Fax:** (11)3085-3505

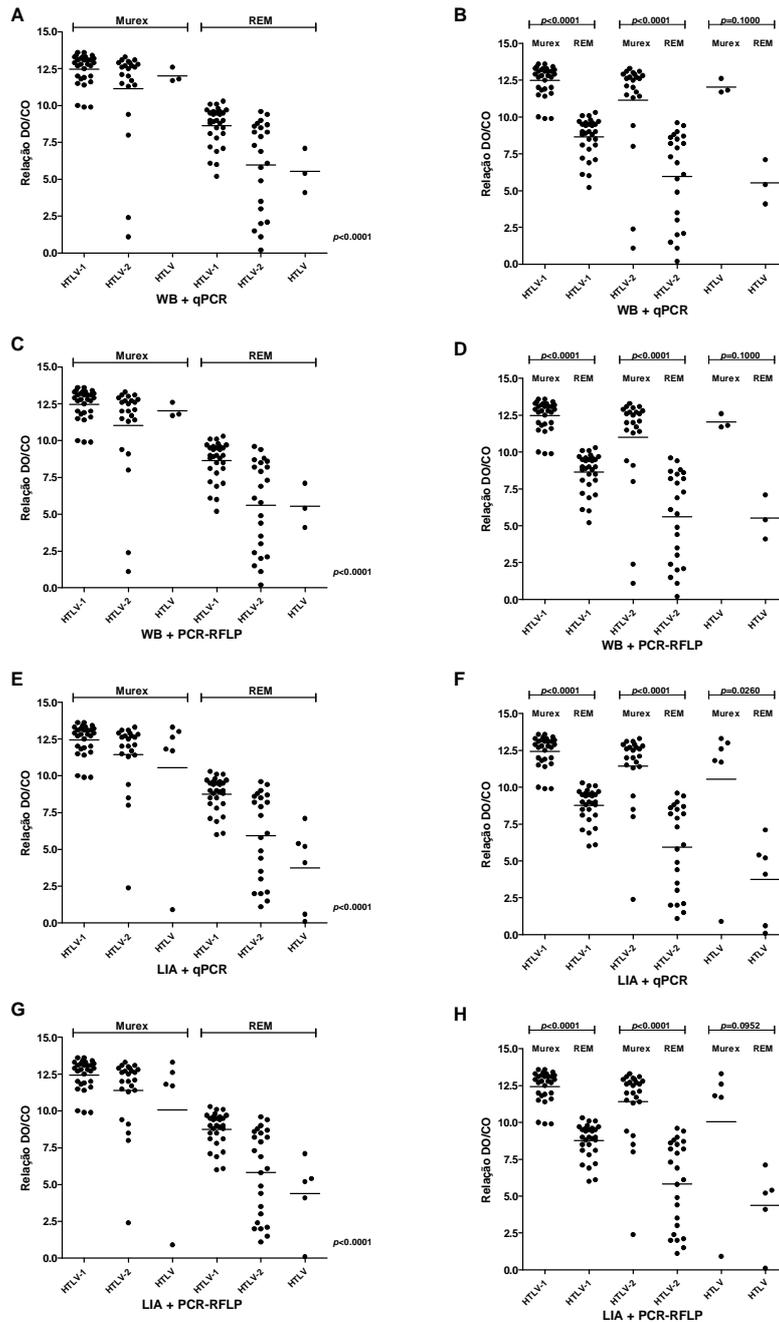
**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

### 8.3



Valores de DO/CO obtidos com os *kits* Murex e REM nas amostras de pacientes com coinfeção HIV/HTLV do Grupo 1 em relação aos resultados de: WB e qPCR [A e B], WB e PCR-RFLP [C e D], LIA e qPCR [E e F] e LIA e PCR-RFLP [G e H] usando-se GraphPad Prism e programas estatísticos de Kruskal-Wallis ANOVA [A ( $p=0.0458$ ), C ( $p=0.1555$ ), E ( $p=0.0289$ ) e F ( $p=0.0942$ )] e Mann-Whitney U-test [B, D, F e H].

## 8.4



Valores de DO/CO obtidos com os *kits* Murex e REM nas amostras de pacientes com coinfeção HIV/HTLV do Grupo 2 em relação aos resultados de: WB e qPCR [A e B], WB e PCR-RFLP [C e D], LIA e qPCR [E e F] e LIA e PCR-RFLP [G e H] usando-se GraphPad Prism e programas estatísticos de Kruskal-Wallis ANOVA [A ( $p=0.0458$ ), C ( $p=0.1555$ ), E ( $p=0.0289$ ) e F ( $p=0.0942$ )] e Mann-Whitney U-test [B, D, F e H].