



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

RITIANE SENA CAETANO

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO
PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO-T HUMANO 1 (HTLV-1) E 2 (HTLV-2)
EM UM SERVIÇO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA**

BELÉM-PA

2019

RITIANE SENA CAETANO

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO
PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO-T HUMANO 1 (HTLV-1) E 2 (HTLV-2)
EM UM SERVIÇO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maísa Silva de Sousa

BELÉM – PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C127a Caetano, Ritiane Sena
Avaliação do diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus linfotrópico-T humano 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) em um serviço de extensão universitária / Ritiane Sena Caetano. — 2019.
71 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Máisa Silva de Sousa Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. HTLV. 2. Diagnóstico. 3. PCR. I. Título.

CDD 579.209811

RITIANE SENA CAETANO

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO
PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO-T HUMANO 1 (HTLV-1) E 2 (HTLV-2)
EM UM SERVIÇO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Belém (PA), 11 de junho de 2019

Banca Examinadora:

Presidente:

Prof^a. Dr^a. Maísa Silva de Sousa (orientadora)

Avaliador Interno:

Prof^a Dr. Eduardo José Melo dos Santos

Avaliador Externo:

Prof^a. Dr^a. Rosimar Neris Martins Feitosa

Avaliador Externo:

Prof. Dr. Felipe Bonfim Freitas

Avaliador Interno:

Prof^a. Dr^a. Mioni Thieli Figueiredo Magalhães de Brito

(suplente)

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, minha fonte de força, sabedoria, fé e esperança que me fez chegar até aqui.

À minha família, especialmente aos meus pais, Robson Canuto e Alda Canuto, minha principal fonte de motivação.

Ao meu namorado, Diego Pereira pelo apoio, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Máisa Silva de Sousa, pela oportunidade de orientação, pelo auxílio no desenvolvimento e concretização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos técnico-científicos, pela confiança, pela amizade e por seu exemplo de ética, dedicação, companheirismo e profissionalismo.

Ao Laboratório de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC), especialmente ao Prof. Dr. Felipe Bonfim Freitas, pela parceria na realização deste trabalho.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto-SP, especialmente a Dr^a Simone Kashima Haddad pela parceria na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Núcleo de Medicina Tropical – UFPA por viabilizarem a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas, ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e ao Laboratório Amaral Costa pela oportunidade de dar continuidade no meu conhecimento técnico-científico e profissional.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1	O VÍRUS LINFOTRÓPICO-T HUMANO (HTLV)	4
2.1.1	Breve histórico do HTLV	4
2.1.2	Morfologia e organização genômica do HTLV	5
2.1.3	Ciclo de replicação do HTLV	7
2.1.4	Transmissão do HTLV	9
2.1.5	Patologias associadas à infecção pelo HTLV-1	10
2.1.6	Epidemiologia do HTLV-1 e do HTLV-2 no mundo	11
2.1.7	Epidemiologia do HTLV-1 e do HTLV-2 no Brasil	12
2.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HTLV-1/2	15
2.2.1	Diagnóstico sorológico	15
2.2.2	Diagnóstico molecular	17
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL E ASPÉCTOS ÉTICOS	22
4.1.1	População de estudo	22
4.1.2	Aspectos éticos	22
4.2	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	23
4.2.1	Coleta e processamento do material biológico	23
4.2.2	Sorologia (pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2)	23
4.2.3	Extração do DNA	24
4.2.4	Amplificação da β globina humana (controle interno da reação)	25
4.2.5	Amplificação da região <i>pX</i> do HTLV	24
4.2.6	Digestão enzimática para caracterização do tipo de HTLV	25
4.2.7	Deteção do DNA proviral por PCR em tempo real (qPCR)	26

4.2.8	Detecção do DNA proviral por PCR multiplex em tempo real (qPCR multiplex)	27
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5	RESULTADOS	29
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	38
8	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	57
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	58
	ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	59

RESUMO

Introdução: O diagnóstico da infecção pelo HTLV é realizado através da detecção de anticorpos anti-HTLV-1/HTLV-2, por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA) e do *Western Blot* (WB) como método de confirmação. As amostras com padrão positivo, mas não tipadas ou indeterminadas são submetidas à reação de PCR. No entanto, o WB tem algumas desvantagens como teste confirmatório, além de apresentar uma frequência elevada de resultados indeterminados, possui também alto custo, maior tempo de realização e estrutura para a sua utilização, o que o torna inviável no serviço de extensão universitária. **Objetivo:** Avaliar e verificar a melhor estratégia metodológica entre os métodos moleculares frente ao ELISA para a confirmação da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2. **Metodologia:** Triagem pelo *Kit* ELISA para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2, separação de leucócitos do sangue periférico, extração de DNA, amplificação e detecção do DNA proviral pelos métodos de PCR convencional (*nested*-PCR) e PCR em tempo real (qPCR e qPCR multiplex). **Resultados:** A *nested*-PCR apresentou a maior sensibilidade e especificidade frente aos outros métodos moleculares, 89,6% e 100%, respectivamente. As combinações ELISA/*nested*-PCR e *nested*-PCR/qPCR apresentaram maior reprodutibilidade. Os métodos de qPCR e qPCR multiplex foram eficientes na resolução de 7 (8,8%) casos falso-negativos na *nested*-PCR. **Conclusão:** A *nested*-PCR apresentou-se como uma excelente opção de método molecular de confirmação e de baixo custo, com o auxílio da qPCR nos casos discordantes frente ao ELISA no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2.

Palavras-chave: Diagnóstico. HTLV. PCR.

ABSTRACT

Introduction: HTLV infection is diagnosed by detection of anti-HTLV-1 / HTLV-2 antibodies by means of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot (WB) as a confirmatory method. Samples with positive pattern but not typed or undetermined are subjected to PCR reaction. However, WB has some disadvantages as a confirmatory test, besides having a high frequency of undetermined results, it also has high cost, longer implementation time and structure for its use, which makes it unviable in the university extension service. **Objective:** To evaluate and verify the best methodological strategy between molecular methods against ELISA for confirmation of HTLV-1 and HTLV-2 infection. **Methodology:** ELISA Screening for Anti-HTLV-1/2 Antibody Detection, Peripheral Blood Leukocyte Separation, DNA Extraction, Amplification and Detection of Proviral DNA by Nested-PCR and Time-PCR real (qPCR and qPCR multiplex). **Results:** Nested-PCR presented the highest sensitivity and specificity compared to other molecular methods, 89.6% and 100%, respectively. The ELISA / nested-PCR and nested-PCR / qPCR combinations showed higher reproducibility. The qPCR and qPCR multiplex methods were efficient in solving 7 (8.8%) false-negative nested-PCR cases. **Conclusion:** Nested PCR proved to be an excellent option for a low-cost, confirmatory molecular method, with the aid of qPCR in discordant ELISA cases in the laboratory diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 infection.

Keywords: Diagnosis. HTLV. PCR.

1. INTRODUÇÃO

O Vírus linfotrópico-T humano (HTLV) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Existem quatro tipos virais conhecidos: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4 (Coffin, 1996). O HTLV-1 e o HTLV-2 são os mais estudados devido as suas maiores proporções de distribuição no mundo. Estes vírus apresentam tropismo por células T, sendo que o HTLV-1 infecta preferencialmente os linfócitos T CD4⁺ e o HTLV-2 os linfócitos T CD8⁺ (Feuer & Green, 2005; Jones *et al.*, 2005).

A infecção crônica pelo HTLV-1 está associada principalmente a Leucemia / Linfoma de Células T do Adulto (LLcTA) e a Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Outras doenças também foram associadas a essa infecção, como uveíte, dermatite, alveolite/bronquiectasias, artrite e nefrite (Sugimoto *et al.*, 1987; LaGrenade *et al.*, 1990; Mochizuki *et al.*, 1992; Deguchi *et al.*, 2003; Kannagi *et al.*, 2004; Yakova *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2006). No entanto, aproximadamente 95% dos portadores desse vírus permanecem assintomáticos durante toda a vida e 5% apresentam sintomas (Andrade *et al.*, 2010; Proietti *et al.*, 2015). O HTLV-2 raramente foi associado a quadros de doenças neurológicas e leucêmicas (Feuer & Green, 2005).

Estima-se uma prevalência aproximadamente de 5 a 10 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV-1 no mundo (Gessain & Cassar, 2012). A Região Amazônica é considerada endêmica para o HTLV, principalmente, o Estado do Pará que se destaca como o terceiro do país com a maior prevalência da infecção pelo HTLV-1 (Catalan-Soares *et al.*, 2005).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV é realizado através de métodos sorológicos para detecção de anticorpos específicos contra o vírus no plasma ou no soro, e, por métodos moleculares que detectam o genoma viral em forma de provírus (Cassar & Gessain, 2017).

Desde 2007 o Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBMC) do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA) realiza a triagem sorológica através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) da infecção pelo HTLV-1/2 por meio de um serviço de extensão universitária. A partir de 2008 foi

introduzido um método molecular de confirmação (*nested-PCR*), além do aconselhamento e atendimento ambulatorial dos indivíduos infectados e seus familiares. No entanto, algumas dificuldades com o uso dessa metodologia (ELISA/*nested-PCR*) no diagnóstico dessa infecção foram observadas devido a frequência de alguns resultados discordantes. Isto é preocupante para os indivíduos, pois permanecem sem qualquer definição do seu verdadeiro estado sorológico (infectado ou não infectado).

O Ministério da Saúde preconiza o *Western Blot* (WB) como método de confirmação, considerado o padrão-ouro para o diagnóstico dessa infecção. No entanto, os principais motivos por não adotar o WB como teste confirmatório no LBMC/NMT/UFPA é o fato do mesmo apresentar uma frequência de resultados indeterminados (Cassar & Gessain, 2017), além do alto custo, tempo de realização e estrutura necessária para a sua utilização (Proietti *et al.*, 2015).

Vários estudos mostraram relevância do uso da PCR em tempo real na detecção da infecção pelo HTLV, bem como na quantificação da carga proviral (Milley *et al.*, 2000; Dehee *et al.*, 2002; Kamihira *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Olindo *et al.*, 2005; Tamegão-Lopes *et al.*, 2006; Altamiriano *et al.*, 2010; Watters *et al.*, 2011; Furtado *et al.*, 2012).

Alguns estudos compararam métodos sorológicos e métodos moleculares para o diagnóstico do HTLV e relataram diferenças na sensibilidade e especificidade entre eles (Altamiriano *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2011; Ishihara *et al.*, 2014; Watters *et al.*, 2011).

Andrade *et al.* (2010) em um estudo em doadores de sangue, detectaram 99,4% de sensibilidade e 98,5% de especificidade na PCR em tempo real em comparação ao WB. Dessa forma, os autores demonstraram a relevância da PCR em tempo real no diagnóstico e tipagem do HTLV nos hemocentros.

Costa *et al.* (2011) investigando o melhor algoritmo para confirmar o diagnóstico de HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos com HIV, mostraram maior sensibilidade no WB do que nos ensaios moleculares. No entanto, dentre os moleculares, a PCR em tempo real foi mais sensível do que a PCR convencional. Assim, recomendaram 2 ensaios imunoenzimáticos para triagem e para confirmação

sugeriram, inicialmente, a PCR em tempo real, em seguida o WB para PCR-negativas.

Ishihara *et al.* (2014) demonstraram que os ensaios sorológicos de triagem apresentaram excelente reprodutibilidade e o WB teve o pior desempenho como teste confirmatório, devido ao grande número de resultados indeterminados. Dessa forma, os autores sugeriram uma combinação de *nested*-PCR e PCR em tempo real como um algoritmo melhor como teste confirmatório para HTLV-1.

Por outro lado, Campos *et al.* (2015) compararam técnicas sorológicas e moleculares para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos infectados por HIV-1. Demonstraram maior sensibilidade nos ensaios sorológicos de confirmação imunoensaio de linha (LIA) e WB do que na PCR em tempo real. No entanto, os autores consideraram apenas o custo e concluíram que o melhor algoritmo para o diagnóstico de indivíduos co-infectados com o HIV-1 é o uso da PCR em tempo real seguida do LIA. Outro estudo realizado pelo mesmo grupo também demonstrou maior sensibilidade nos ensaios sorológicos de confirmação no LIA e WB do que na PCR em tempo real e PCR convencional. No entanto, os autores não avaliaram o custo e recomendaram o LIA como único ensaio de confirmação (Campos *et al.*, 2017).

Dessa forma, a importância desse estudo é verificar a melhor estratégia metodológica para a confirmação da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, garantido assim um melhor monitoramento e controle dessa infecção.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O VÍRUS LINFOTRÓPICO-T HUMANO (HTLV)

2.1.1 Breve histórico do HTLV

O Vírus Linfotrópico-T Humano (HTLV) foi isolado pela primeira vez em 1980, nos Estados Unidos da América (EUA), por Poiesz e colaboradores a partir de linfócitos de um paciente com linfoma de células T (Poiesz *et al.*, 1980). Em 1982, no Japão, Yoshida e colaboradores isolaram um vírus de pacientes com leucemia e o nomearam como Vírus Associado à Leucemia de Células T de Adulto (ATLV) (Yoshida *et al.*, 1982).

Dois anos depois, Watanabe e colaboradores compararam por métodos moleculares os dois isolados encontrados por Poiesz *et al.* (1980) e Yoshida *et al.* (1982), e constataram que esses isolados eram retrovírus da mesma espécie, nomeando como Vírus Linfotrópico de Células T Humana Tipo 1 – HTLV-1 (Watanabe *et al.*, 1984).

Estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais levaram a descoberta da associação do HTLV-1 e a paraparesia espástica tropical e mielopatia (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986). As semelhanças encontradas nos aspectos clínico-laboratoriais desses pacientes permitiram nomear essa doença como Paraparesia Espástica Tropical / Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (Roman & Osame, 1988).

Em 1982, Kalyanaraman e colaboradores identificaram um vírus semelhante àquele isolado por Poiesz *et al.* (1980) e Yoshida *et al.* (1982), em um paciente com tricoleucemia pilosa, mas alguns marcadores imunológicos encontrados nesse vírus eram diferentes. Então, sugeriram que se tratava de um novo tipo viral e o nomearam de HTLV-2 (Kalyanaraman *et al.*, 1982). A origem do HTLV-3 e HTLV-4 é desconhecida, mas sugere-se que eles possam ter surgido por transmissão zoonótica, assim como o HTLV-1 e HTLV-2, através do contato com primatas infectados pelos *Vírus de Células T de Símios* (STLV-3) (Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005).

2.1.2 Morfologia e organização genômica do HTLV

A morfologia do HTLV é semelhante à de outro retrovírus (Felber *et al.*, 1985). A partícula viral mede entre 80 a 100 nm de diâmetro e apresenta morfologia complexa que consiste de um envelope e um nucleocapsídeo (Coffin,1996; Tangy, 1996;). No envelope, há projeções da superfície que são formadas pelas glicoproteínas de superfície gp46 e as glicoproteínas transmembranas gp21, estas são constituídas de pequenas espículas que estão densamente dispersas uniformemente em toda a superfície viral. A matriz é constituída pelas proteínas p19 que envolvem o capsídeo icosaédrico, este por sua vez, é constituído pelas proteínas p15 e p24. No interior do capsídeo se encontram as proteínas: Integrase (p32), Protease (p10) e a Transcriptase Reversa (p55), ambas essenciais na replicação viral (Coffin,1996; Tangy, 1996) (Figura 1).

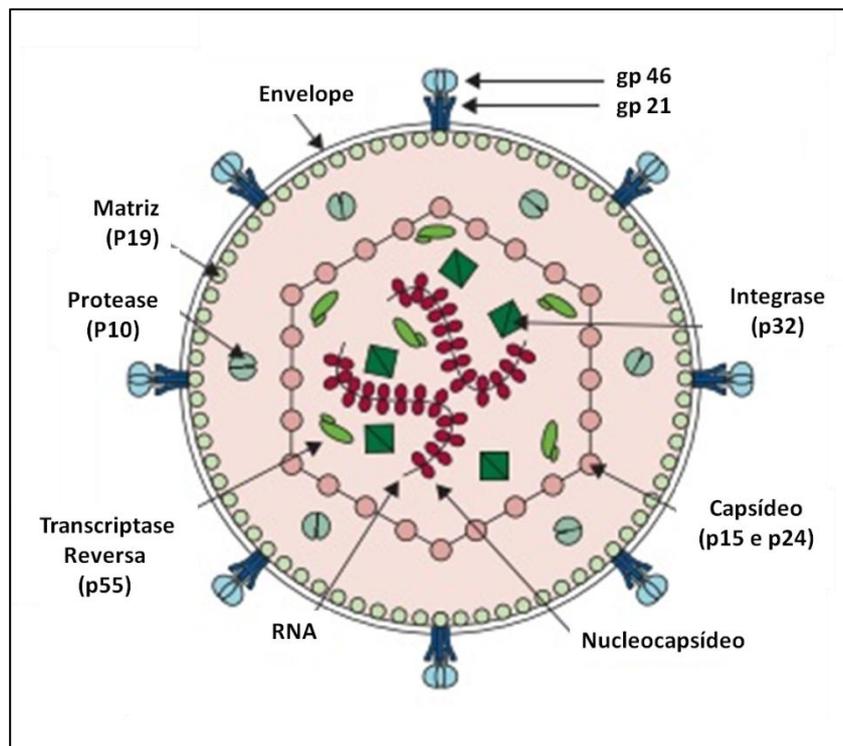


Figura 1: Representação esquemática da partícula madura do HTLV-1 representando sua estrutura e composição (Adaptado de Verdonck *et al.*, 2007).

O genoma do HTLV é semelhante ao de outros retrovírus, sendo composto por duas fitas simples de RNA de polaridade positiva (ssRNA⁺). O genoma do HTLV-1 e do HTLV-2 possuem 9kb e 8,9kb, respectivamente. O HTLV-2 tem uma estrutura genômica semelhante e compartilha aproximadamente 70% de homologia de sequência de nucleotídeos com HTLV-1. O genoma do HTLV possui os genes *gag* (antígeno grupo específico), *pol* (polimerase), *env* (envelope), *pro* (protease), *hbx* (*basic leucine zipper factor*), entre outros. O genoma também tem uma região que é exclusiva desse vírus, chamada região *pX*, que contém os genes reguladores *tax* (transativador) e *rex* (regulador da expressão), ambos codificados pela região de leitura aberta (*open reading frames* – ORF) do genoma. Já as extremidades são flanqueadas por duas terminações longas repetidas (*long terminal repeats* - LTR) (Feuer & Green, 2005; Felber *et al.*, 1985) (Figura 2).

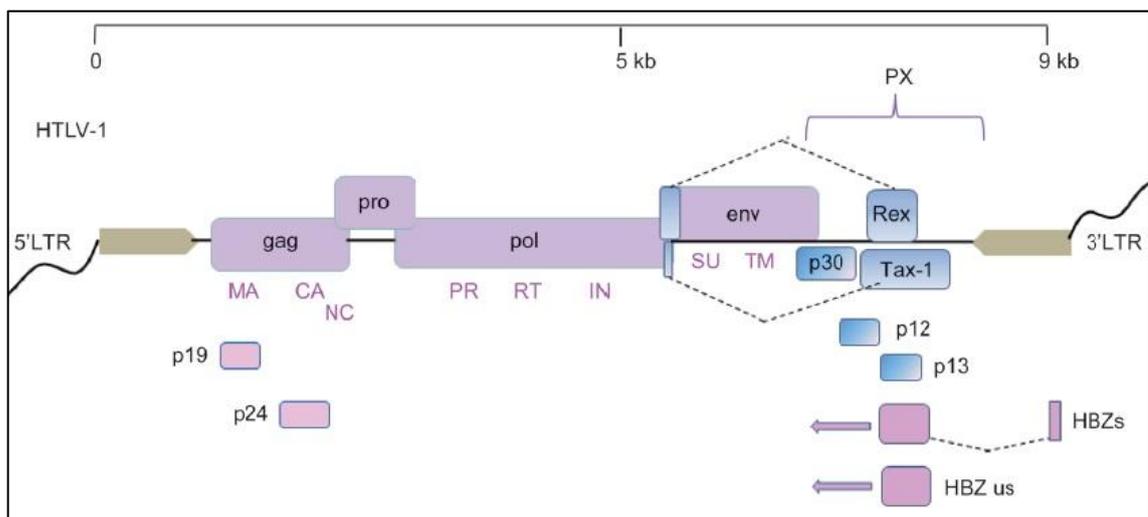


Figura 2: Representação esquemática do genoma do HTLV-1 (Adaptado de Zhang *et al.*, 2017).

O gene *gag* codifica um polipeptídeo que é clivado por uma protease para formar as proteínas estruturais virais da matriz (p19), nucleocapsídeo, (p15) e do capsídeo (p24). O gene *pol* (polimerase) codifica a Transcriptase Reversa (RT), a Ribonuclease H (RNase H) e a Integrase (IN), sendo as duas primeiras responsáveis pela síntese do genoma viral e a última responsável pela integração desse genoma na célula hospedeira. A região *pro* (protease) se encontra sobreposta aos genes *gag* e *pol*, a mesma codifica uma protease (PR) que será responsável por

clivar as poliproteínas dos genes *gag* e *pol* (Shimotohno *et al.*, 1985; Le Blanc *et al.*, 2001).

O gene *env* (envelope) codifica uma poliproteína (gp62), que posteriormente, é clivada para formar as glicoproteínas do envelope viral: a glicoproteína de superfície (gp46) e a glicoproteína transmembrana (gp21), ambas promovem a entrada do HTLV na célula hospedeira; sendo que a primeira interage com os receptores celulares e a segunda promove a fusão entre membranas virais e celulares (Maeda *et al.*, 2015).

A região *pX* contém os genes reguladores da transcrição viral: *tax* e *rex*, codificados pela região de leitura aberta (ORF) IV e III, respectivamente. O gene *tax* é um transativador que aumenta a taxa de transcrição viral (Felber *et al.*, 1985) e modula a transcrição de outros genes celulares envolvidos na proliferação e diferenciação celular (Ressler *et al.*, 1997). Sendo assim, o gene *tax* apresenta um importante papel oncogênico na transformação de células T humanas primárias (Robek & Ratner, 1999; Ross *et al.*, 1996). O gene *rex* é um regulador pós-transcricional da expressão viral do RNA mensageiro (RNAm), transportando-o do núcleo para o citoplasma (Younis & Green, 2005).

O gene *hbz* (*Basic leucine zipper factor*) está localizado na extremidade 3' LTR na fita negativa do provírus e codifica a proteína fator zíper de leucina básico (HBZ). Os genes *hbz* e *tax* em conjunto estão fortemente associados à proliferação de linfócitos T (Satou *et al.*, 2006; Giam & Semmes, 2016).

2.1.3 Ciclo de replicação do HTLV

Primeiramente, ocorre a adsorção e a penetração do HTLV na célula alvo, através da interação entre as glicoproteínas do envelope viral (gp46 e gp21) com os receptores de superfície celular (GLUT-1, HSPG e NRP-1). Na adsorção, a glicoproteína de superfície (gp46) se liga primeiro ao receptor *heparan sulfate proteoglicans* (HSPG), seguido pelo receptor *neuropilin-1* (NRP-1), formando um complexo. Após isso, o transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1) se liga ao complexo HSPG/NRP-1. Na penetração, a glicoproteína transmembrana (gp21) promove a fusão entre as membranas virais e celulares permitindo a liberação do

genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (Manel *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005; Ghez *et al.*, 2006).

Após a entrada do genoma viral no citoplasma da célula, a poliproteína de Gag-Pol é clivada pela ação da protease para produzir a transcriptase reversa e a integrase (Dunn *et al.*, 2002). A transcrição reversa do RNA viral (ssRNA⁺) ocorre pela ação da transcriptase reversa, formando o DNA viral (dsDNA). Este será transportado para o núcleo onde é integrado ao genoma da célula hospedeira em forma de provírus, através da ação da integrase. Quando o provírus já está integrado ao genoma da célula, ocorre a transcrição do RNA viral em mRNAs virais, a partir de iniciadores localizados na extremidade 3'(LTR) do genoma viral. Por fim, ocorre tradução das proteínas virais, montagem das novas partículas virais e sua liberação por brotamento (Proietti *et al.*, 2015) (Figura 3).

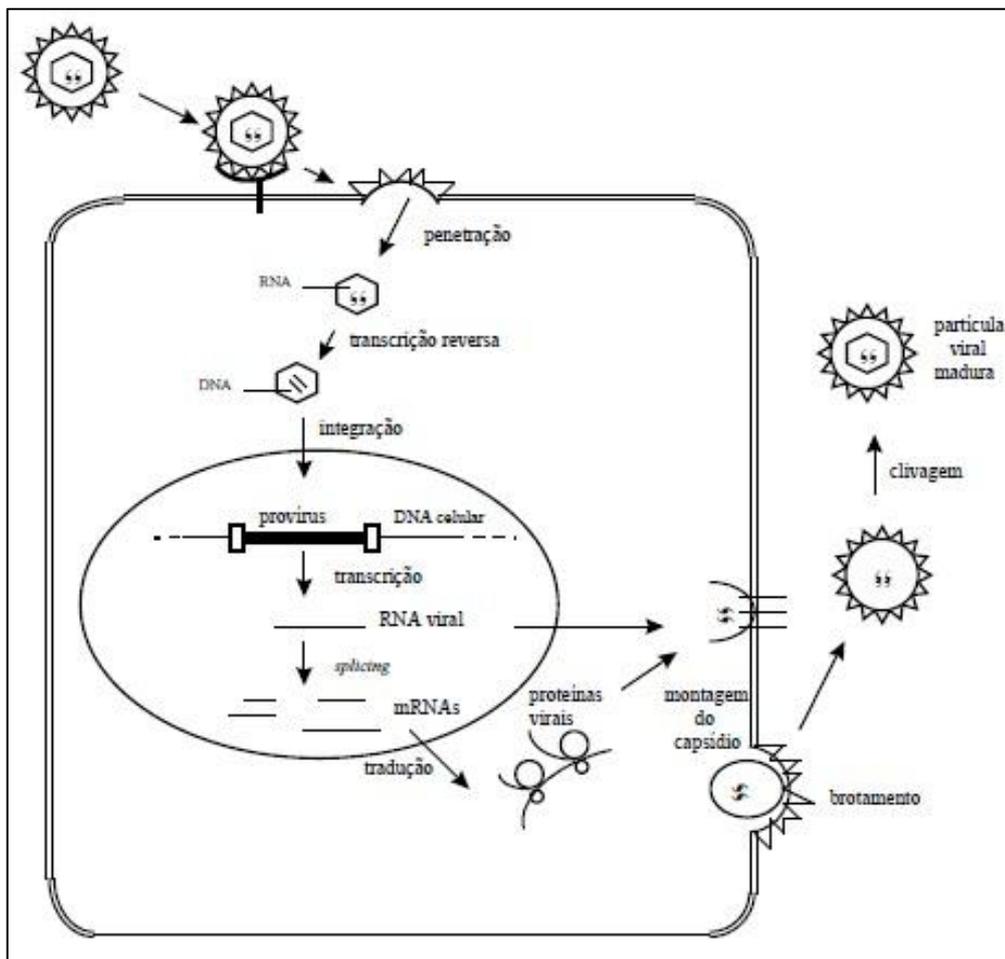


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação do HTLV (Adaptado de Proietti *et al.*, 2015).

2.1.4 Transmissão do HTLV

A transmissão do HTLV ocorre através da transfusão de sangue e hemocomponentes, compartilhamento de agulhas e seringas, relação sexual desprotegida e transmissão vertical - mãe para filho (Okochi *et al.*, 1984; Hino *et al.*, 1985; Murphy *et al.*, 1989).

A via de transmissão do HTLV por transfusão de sangue tem se tornado menos significativa desde que o Ministério da Saúde tornou obrigatório o teste de triagem para HTLV-1/2 em hemocentros a partir de 1993 (Proietti *et al.*, 2015).

A transmissão sexual do HTLV do homem para mulher é mais eficiente do que o contrário (Kajiyama *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1991), no entanto, úlceras genitais podem aumentar a transmissão sexual da mulher para o homem (Murphy *et al.*, 1989). Um estudo realizado na população de Salvador - BA mostrou que a transmissão sexual é a principal forma de infecção pelo HTLV-1 (Nunes *et al.*, 2017).

A transmissão do HTLV de mãe para filho está intimamente associada à carga proviral da mãe, altos títulos de anticorpos e amamentação prolongada (Kinoshita *et al.*, 1987; Ureta-Vidal *et al.*, 1999). Para prevenir a transmissão vertical recomenda-se realizar a triagem pré-natal ou neonatal para diagnosticar a infecção viral e aconselhar a mãe evitar a amamentação (Ribeiro *et al.*, 2012).

2.1.5 Patologias associadas à infecção pelo HTLV-1

A Leucemia/Linfoma de células T do adulto (LLcTA) é uma neoplasia agressiva de linfócitos T causada pela infecção crônica pelo HTLV-1 (Ohshima, 2015). A LLcTA é classificada em quatro variantes clínicas: aguda, linfomatosa, crônica e *smoldering* (oligo-sintomático). Essa classificação baseia-se no envolvimento de órgãos, manifestação leucêmica, valores de lactato desidrogenase (LDH) e cálcio, sendo fundamental para a escolha do tratamento apropriado (Tsukasaki & Tobinai, 2013). A variante aguda é a mais agressiva, apresentando leucocitose marcada, lesões cutâneas, linfadenopatia maciça, organomegalia, e ainda, complicações respiratórias. A variante linfomatosa apresenta linfadenopatia marcada. A variante crônica apresenta uma erupção cutânea exfoliativa, leucocitose moderada e normocalcemia, e, a variante *smoldering*, geralmente é assintomática (Rodriguez-Zuniga *et al.*, 2017).

O diagnóstico de LLcTA é baseado na combinação das características clínicas com a confirmação da infecção pelo HTLV-1. A morfologia celular típica da LLcTA são linfócitos atípicos com núcleos polilobulados e cromatina grosseira identificados no esfregaço de sangue periférico da maioria dos indivíduos afetados. Esses linfócitos atípicos são tipicamente mencionados como “*flower cells*”, pois lembram flores ou um trevo (Rodriguez-Zuniga *et al.*, 2017). Os tratamentos para LLcTA incluem terapias antivirais com interferon - alfa (IFN-) e zidovudina (AZT), quimioterapia, transplante de células-tronco hematopoiéticas alogênicas e outros agentes como, análogos de purinas, Inibidores das histonas desacetilases (HDI's), Anticorpos monoclonais (mAbs), Lenalidomida, Bortezomibe e o pralatrexato (Tsukasaki & Tobinai, 2013).

A Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH) é uma desordem neurológica, inflamatória e crônica causada por uma desmielinização progressiva do Sistema Nervoso Central - SNC (Takatani *et al.*, 2017). Essa doença é caracterizada por quadros de paraparesia, principalmente em membros inferiores, distúrbios esfinterianos e sensoriais, sendo mais prevalente no sexo feminino e em indivíduos na faixa etária de 40 a 50 anos (Kaplan *et al.*, 1990).

Os sintomas clássicos da PET/MAH incluem fraqueza progressiva, dor crônica na lombar e nos membros inferiores, incontinência urinária, hiperreflexia,

sinal de Babinski, anormalidades de sensibilidade dos membros inferiores, além de outros sintomas associados, como disfunção erétil, diminuição da libido e constipação (Reiss *et al.*, 2014). A progressão clínica da PET/MAH está associada a um aumento da carga proviral, proliferação e migração dos linfócitos infectados para o SNC (Saito *et al.*, 2012).

O diagnóstico para PET/MAH baseia-se nos aspectos clínicos e na confirmação da infecção pelo HTLV-1, e ainda, na exclusão de outros distúrbios que podem se assemelhar a PET/MAH (BRASIL, 2013).

Os tratamentos disponíveis até o momento para PET/MAH não são curativos, apenas contribuem para a melhora clínica, redução da carga proviral do HTLV-1 e da inflamação. Estes incluem antirretrovirais, corticosteróides, medicamentos imunossupressores, anticorpos monoclonais, interferons, entre outros. Assim, o prognóstico depende da carga proviral e da resposta imunológica do hospedeiro (Gonçalves *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2014).

2.1.6 Epidemiologia do HTLV-1 e do HTLV-2 no mundo

O HTLV-1 está presente em todo o mundo de forma heterogênea, sendo as áreas de maior prevalência o Japão, África subsaariana, América do Sul, Caribe, Oriente Médio e a região da Australo-Melanésia. Estima-se uma prevalência aproximadamente de 5 a 10 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV-1. No entanto, esses resultados foram baseados em apenas 1,5 bilhões de indivíduos originários de áreas endêmicas conhecidas do HTLV-1 com dados epidemiológicos confiáveis disponíveis. Estimativas corretas em outras áreas altamente populosas, como a China, Índia, o Marrocos e a África oriental não foram possíveis. Portanto, o número de portadores desse vírus é provavelmente maior (Gessain & Cassar, 2012) (Figura 4).

O HTLV-2 está presente em grupos populacionais distintos pelo mundo, sendo mais prevalente em populações indígenas na África e nas Américas, e, em usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos e na Europa (Roucoux & Murphy, 2004).



Figura 4: Distribuição geográfica dos principais focos de infecção pelo HTLV-1 no mundo (Adaptado de Gessain & Cassar, 2012).

2.1.7 Epidemiologia do HTLV-1 e do HTLV-2 no Brasil

A soroprevalência do HTLV-1 e do HTLV-2 varia de acordo com comportamentos de riscos individuais, fatores socioeconômicos e demográficos. Estudos de prevalência em grupos específicos confirmam a presença do HTLV-1 e do HTLV-2 em todo o país (Proietti *et al.*, 2015). Até o momento, os estudos que mais se aproximam da real prevalência da infecção, são os realizados em doadores de sangue. Os estados com a maior prevalência da infecção pelo HTLV-1 entre os doadores de sangue estão na Região Norte e Nordeste do país, destacando-se o Estado do Maranhão, Bahia e o Pará (Catalan-Soares *et al.*, 2005) (Figura 5).

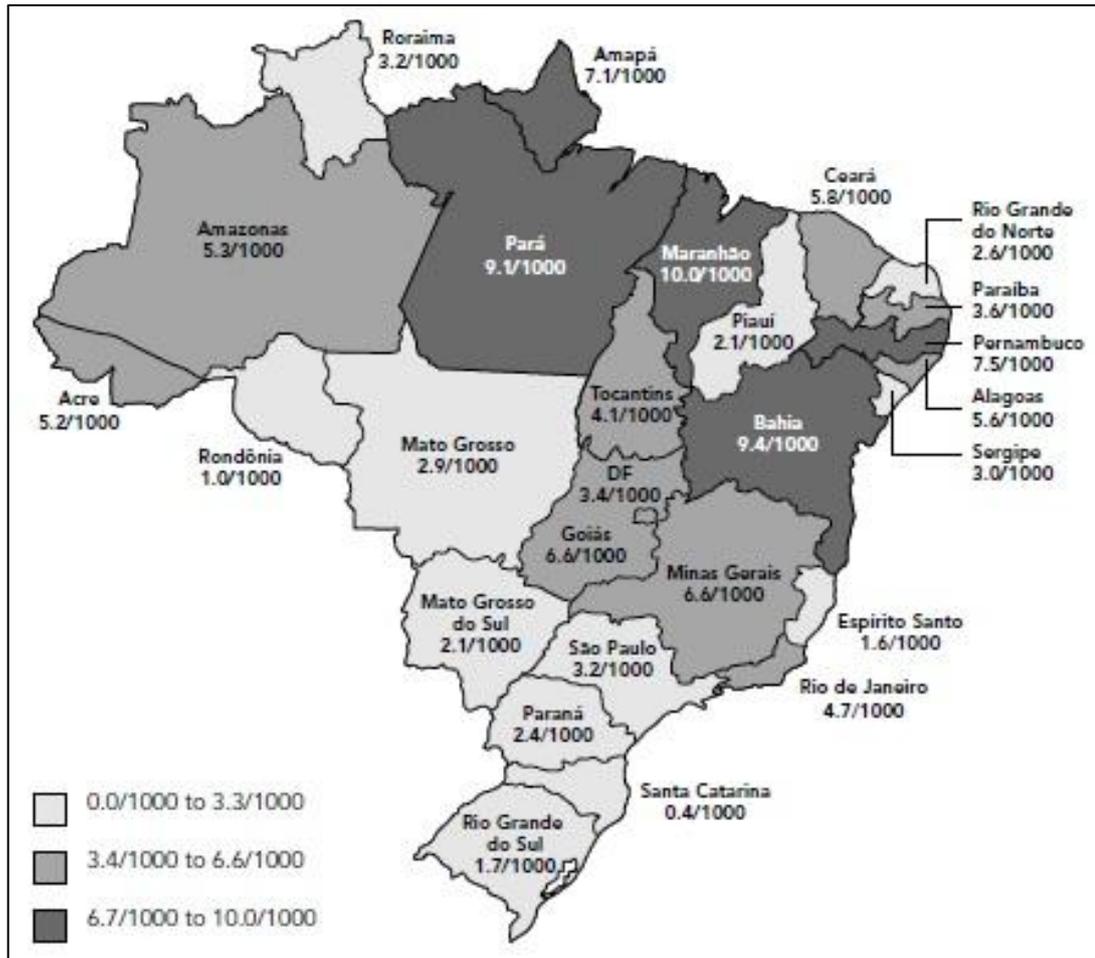


Figura 5: Prevalência da infecção pelo HTLV-1 entre doadores de sangue no Brasil (Adaptado de Catalan-Soares *et al.*, 2005).

A cidade de Salvador (BA) é considerada um epicentro da infecção pelo HTLV-1, tendo sido encontrada uma prevalência de 1,3% em doadores de sangue (Galvão-Castro *et al.*, 1997), 0,8% em mulheres grávidas (Bittencourt *et al.*, 2001) e 1,7% na população geral (Dourado *et al.*, 2003). Um estudo mostrou que a cidade de Salvador continua a ser uma área importante para a vigilância da infecção pelo HTLV-1, pois a prevalência entre a população geral permanece acima de 1% (1,4%) (Nunes *et al.*, 2017). No Maranhão, a prevalência encontrada foi de 0,15% em doadores de sangue (Viana *et al.*, 2014) e de 0,1% em mulheres grávidas no Mato Grosso do Sul (Figueiró-Filho *et al.*, 2005).

No Estado do Pará, vários estudos confirmaram a endemicidade do HTLV-1 e do HTLV-2 na região amazônica, sendo estes em indígenas, ameríndios, quilombolas, imigrantes japoneses, doadores de sangue, ribeirinhos e população

urbana do estado, sendo descritos a seguir (Ishak *et al.*, 1995; Ishak *et al.*, 1991; Ishak *et al.*, 2001; Vallinoto *et al.*, 2002; Ishak *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009; Vallinoto *et al.*, 2004; Vallinoto *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013; Magno *et al.*, 2013; Aguiar *et al.*, 2017).

Ishak *et al.* (1995) investigaram a soroprevalência do HTLV-1 e HTLV-2 em comunidades indígenas na Amazônia, tendo sido encontrada a prevalência de 7,8% de portadores do HTLV-2, revelando que a transmissão vertical do HTLV-2 é uma importante via de infecção nesta população. Estudos posteriores encontraram a presença da infecção pelo HTLV-2c em indígenas (Ishak *et al.*, 2001), ameríndios e na população urbana (doadores de sangue) (Vallinoto *et al.*, 2002).

Os primeiros casos no Pará da associação de PET/MAH à infecção pelo HTLV-1 foram encontrados por Ishak *et al.* (2002). Quatro anos depois, Souza *et al.* (2006) encontraram associação da infecção pelo HTLV-1a, subgrupo Transcontinental (A) em pacientes com distúrbio neurodegenerativo típico de PET/MAH.

Santos *et al.* (2009) em um estudo em doadores de sangue, entre os que foram soropositivos para HTLV-1/2, 71% confirmaram por biologia molecular a infecção pelo HTLV-1, subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental e 29% HTLV-2c. Vallinoto *et al.* (2004) encontraram uma prevalência de 1,8% (3/168) da infecção pelo HTLV-1 em imigrantes japoneses na cidade de Tomé-Açú. Todos os portadores dessa infecção vieram da Região de Kyushu no Japão, amplamente conhecida pela alta prevalência de HTLV-1 e de Paraparesia Espástica Tropical (PET/MAH). O mesmo grupo de pesquisadores encontrou em comunidades quilombolas na Ilha do Marajó uma prevalência no total de 1,15% (3/197) de portadores do HTLV-1 nos municípios de Santana do Arari e Ponta de Pedras, e 1,03% (1/97) portadores do HTLV-2 apenas em Santana do Arari (Vallinoto *et al.*, 2006).

Ferreira *et al.* (2010) encontraram em comunidades ribeirinhas do interior do estado uma prevalência de 1,14% (2/175) para HTLV-1/2, sendo confirmada por biologia molecular a infecção pelo HTLV-1. Costa *et al.* (2013) em um estudo de transmissão intrafamiliar para HTLV na região metropolitana de Belém, encontraram

uma prevalência de 43,5% (37/85) nas famílias e 25,6% (58/227) de forma individual.

Magno Falcão *et al.* (2013) encontraram em comunidades localizadas às margens da usina hidrelétrica de Tucuruí uma prevalência de 4,7% (31/657) para HTLV, porém sem confirmação molecular dessa infecção. Na ilha do Marajó, foi observada uma prevalência de 0,11% (2/1899), sendo confirmada por sequenciamento e análise filogenética a infecção pelo subtipo Cosmopolita 1 (HTLV-1a) e subgrupo Transcontinental (A) (Aguiar *et al.*, 2017). Uma moderada prevalência (2%) e disseminação intrafamiliar da infecção pelo HTLV-1/2 foi encontrada em indivíduos adultos da região metropolitana de Belém (Silva *et al.*, 2018).

2.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HTLV

O Ministério da Saúde recomenda o ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1/HTLV-2 e confirmação pelo *Western Blot* (WB), sendo este considerado o padrão ouro para o diagnóstico dessa infecção. As amostras com padrão positivo, mas não tipadas ou indeterminadas são submetidas à confirmação por PCR. O uso do WB para o diagnóstico do HTLV está em processo de incorporação no Sistema Único de Saúde (SUS) e a PCR pode ser realizada por alguns laboratórios públicos de referência e universidades (BRASIL, 2013; Proietti *et al.*, 2015).

2.2.1 Diagnóstico sorológico

Os métodos sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo HTLV são classificados em testes de triagem e testes de confirmação. Os testes de triagem mais conhecidos são o ensaio imunoenzimático (EIA) e o teste de aglutinação de partículas (PA), e os testes de confirmação são a imunofluorescência indireta, radioimunoprecipitação e o *Western Blot* (WB) (Proietti *et al.*, 2015).

O método mais utilizado na triagem sorológica do HTLV é o ensaio imunoenzimático (EIA). Este é constituído por uma placa de poliestireno em que

estão adsorvidos os antígenos específicos que após a adição do conjugado anti-Ig humana marcado com uma enzima ao soro ou plasma do indivíduo, a reação é revelada após a incubação. O resultado dependerá da intensidade da cor resultante (densidade ótica) medida por um espectrofotômetro, a partir de um valor de corte definido ou “*cut-off*”. Caso o resultado do teste de triagem seja reagente, deve-se realizar um teste confirmatório. A vantagem desse método é ser simples e ter boa sensibilidade e as desvantagens é a baixa especificidade e não diferenciar o tipo viral (HTLV-1 ou HTLV-2), devido à alta homologia das proteínas estruturais entre os dois vírus e pelo fato do próprio “layout” do teste ser realizado em um único poço (Proietti *et al.*, 2015). Por isso, os ensaios imunoenzimáticos comercializados possuem o título “HTLV-1/2”, sendo o *Enzyme Linked Immuno Assay* (ELISA) o mais utilizado devido ao seu nível de padronização e ao grande número de kits comerciais disponíveis (Cassar & Gessain, 2017).

Outro método de triagem sorológica é o teste de aglutinação de partículas (PA) de gelatina ou látex sensibilizadas com antígenos virais inativados. Esse método baseia-se na aglutinação das partículas sensibilizadas na presença de anticorpos anti-HTLV no soro/plasma ou LCR de indivíduos infectados. A vantagem desse teste é a boa sensibilidade, fácil e rápida execução e não requer equipamentos. A leitura pode ser qualitativa ou quantitativa. A desvantagem, assim como no teste imunoenzimático, é que não discrimina o HTLV-1 do HTLV-2, além da baixa especificidade (Proietti *et al.*, 2015; Cassar & Gessain, 2017).

Quanto aos métodos de confirmação, a imunofluorescência indireta (IFA) baseia-se na visualização, através da fluorescência, da interação entre antígenos do HTLV-1/2, presentes em linhagens celulares infectadas, com os anticorpos anti-HTLV presentes no plasma/soro. As linhagens celulares utilizadas são a MT2 e C19, infectadas com o HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente. A comparação entre essas duas linhagens celulares é que permite geralmente diferenciar entre HTLV-1 e HTLV-2. A titulação de anticorpos é permitida através da diluição em série do soro. A vantagem deste teste é apresentar alta sensibilidade e especificidade para confirmar e titular anticorpos anti-HTLV-1/2. As desvantagens desse teste é que além de ser pouco utilizado no Brasil, requer a manutenção de linhagens celulares contínuas que só é possível em laboratórios altamente equipados e com profissionais especializados (Proietti *et al.*, 2015; Cassar & Gessain, 2017).

O teste de radioimunoprecipitação (RIPA) baseia-se na utilização de antígenos do HTLV-1 e HTLV-2 radiomarcados, derivados de linhagens celulares infectadas, para detectar anticorpos específicos contra o vírus no soro ou no plasma. O imunoprecipitado é analisado por meio da eletroforese em gel. A vantagem deste teste é ter maior sensibilidade e maior especificidade devido a sinais mais intensos e a falta de enzimas endógenas como no EIA. A desvantagem é por ser um teste mais oneroso e requer autorização específica para o uso de isótopos radioativos (Proietti *et al.*, 2015; Cassar & Gessain, 2017).

O *Western Blot* (WB) é um teste imunoenzimático que utiliza como antígenos virais, proteínas com epítomos recombinantes, correspondentes à porção N-terminal transmembrana (gp21) do HTLV-1/2. Essas proteínas são submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida, permitindo a separação de acordo com o seu peso molecular. Após a eletroforese, as proteínas virais específicas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose e irão interagir com os anticorpos presentes no soro/plasma ou LCR. A leitura é realizada por meio da visualização das bandas identificadas na membrana de nitrocelulose, sem a necessidade de utilização de algum tipo de aparelho (Proietti *et al.*, 2015; Cassar & Gessain, 2017).

A Organização Mundial da Saúde definiu os critérios de positividade que inclui a reatividade para as proteínas da região gag (p19 ou p24) e para as proteínas do envelope viral (gp46 e gp21), para que uma amostra seja considerada positiva. O teste é considerado negativo quando não apresenta reatividade para essas proteínas e quando apresentar uma reatividade parcial é considerado indeterminado. A vantagem do WB é apresentar alta especificidade em detectar anticorpos contra antígenos virais específicos, além de definir HTLV-1 e HTLV-2, e as desvantagens são o alto custo, teste demorado e elevados números de resultados indeterminados (Proietti *et al.*, 2015).

2.2.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular é usado para confirmar a infecção pelo HTLV-1 ou HTLV-2 devido à alta sensibilidade e especificidade, pois detecta o genoma do vírus que está integrado ao DNA da célula hospedeira em forma de provírus, pois o

HTLV não apresenta viremia plasmática. O seu uso era restrito à pesquisa inicialmente, no entanto, está cada vez mais sendo utilizado na rotina devido a diminuições nos custos dos reagentes de biologia molecular e a introdução de métodos de PCR em tempo real (Cassar & Gessain, 2017).

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência genômica do DNA proviral, sendo necessária a utilização da enzima *Taq* DNA polimerase, iniciadores ou *primers* e bases nucleotídicas. O produto da PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida para posterior visualização dos fragmentos amplificados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (Proietti *et al.*, 2015).

A *nested-PCR* (*nested Polymerase Chain Reaction - nested PCR*) é uma modificação da PCR destinada a aumentar a sensibilidade e a especificidade da reação. A *nested-PCR* é baseada em uma segunda amplificação, utilizando como molde o produto da amplificação anterior e um par de *primers* situado na posição interna ou flanqueado na sequência do DNA proviral à do par de *primers* consensuais utilizados na amplificação anterior. A distinção entre HTLV-1 e HTLV-2 é realizada através da restrição enzimática do produto da *nested-PCR*, utilizando as enzimas de restrição *Sau* 3 ou *Taq* 1. O produto da digestão enzimática é submetido à eletroforese em gel de agarose e visualizado por meio de um transiluminador com fonte de luz ultravioleta (Proietti *et al.*, 2015).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction – qPCR*) ou reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) é uma variação da PCR convencional que além de detectar, permite também, quantificar a carga proviral (Proietti *et al.*, 2015).

A plataforma de PCR em tempo real contém um termociclador com sistema óptico e um computador com *software* para aquisição dos dados e análise final da reação. Os sistemas de emissão de luz mais utilizados para a PCR em tempo real são o *TaqMan*[®] e o sistema *SYBR Green*[®]. O sistema *TaqMan*[®] é baseado na detecção utilizando uma sonda duplamente marcada que será degradada pela atividade da 5' exonuclease da *Taq* DNA polimerase, detectando produtos específicos durante a reação de PCR em tempo real. As vantagens do uso desse sistema é que o sinal de fluorescência é produzido por hibridização de sondas

específicas, reduzindo significativamente o aparecimento de sinais falso-positivos. As desvantagens são que para cada sequência-alvo é necessário uma sonda diferente, além do alto custo para a implementação em larga escala e mão de obra altamente qualificada (Nascimento *et al.*, 2010).

No sistema *SYBR Green*[®], os fluoróforos ligam-se em toda a dupla fita de DNA formada, emitindo fluorescência. Durante a desnaturação da dupla fita a fluorescência é drasticamente reduzida. No processo de polimerização da DNA polimerase, os fluoróforos se ligam às duplas fitas em formação, resultando na emissão de fluorescência. As vantagens do uso do sistema *SYBR Green*[®], são amplificação de sinal de qualquer sequência de dupla fita de DNA, reduzindo o custo dos ensaios, pois não é necessário o uso de sondas. A desvantagem é a produção frequente de sinais falso-positivos, pois os fluoróforos se ligam a qualquer dupla fita, incluindo sequências inespecíficas e dímeros de *primers* (Nascimento *et al.*, 2010). Portanto, a PCR em tempo real possui elevada sensibilidade e especificidade com uma larga escala de detecção (Cassar & Gessain, 2017).

A PCR multiplex em tempo real é uma variação desta técnica, na qual duas ou mais sequências alvo podem ser amplificadas, incluindo-se mais de um par de *primers*, podendo detectar e quantificar o HTLV-1, HTLV-2 e o controle interno na mesma reação (Estes *et al.*, 2003; Watters *et al.*, 2011).

Existem três algoritmos que podem ser utilizados na confirmação diagnóstica laboratorial do HTLV-1/2. No algoritmo clássico as amostras reativas no teste de triagem são submetidas ao *Western Blot* (WB) e as amostras com padrão positivo, mas não tipadas ou indeterminadas são submetidas à reação de PCR. No entanto, a principal desvantagem desse algoritmo é a frequência elevada de amostras indeterminadas no WB (Proietti *et al.*, 2015).

No segundo algoritmo, as amostras reativas no teste de triagem são confirmadas diretamente com a técnica de PCR. A vantagem desse algoritmo é que a PCR é mais conclusiva e, geralmente, é mais barata que o teste de WB. A principal desvantagem é o fato de não existir teste comercial de PCR e a sensibilidade e especificidade dos testes "*in house*" podendo variar consideravelmente (Proietti *et al.*, 2015).

O terceiro algoritmo sugere a utilização de um segundo teste imunoenzimático (EIA), antes de se indicar o teste confirmatório. A vantagem deste algoritmo é a diminuição do número de amostras para a realização do teste confirmatório. Neste algoritmo, pode se optar por dois testes confirmatórios, tanto pelo WB (algoritmo 1) quanto pela PCR (algoritmo 2) (Proietti *et al.*, 2015).

De um modo geral, o diagnóstico molecular apresenta elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV, sendo fundamental para elucidar resultados inconclusivos nos testes sorológicos do tipo ELISA e indeterminados no WB, e também no diagnóstico da transmissão vertical, uma vez que os testes sorológicos não podem ser indicativos de infecção, devido à transferência passiva de anticorpos maternos, e ainda, para detectar a infecção viral durante o período compreendido entre a exposição e a soroconversão (Proietti *et al.*, 2015).

As desvantagens são quanto aos fatores que podem interferir na resolução da técnica como, iniciadores inadequados, quantidade e qualidade insuficiente de DNA extraído, ausência de padronização da metodologia, resultados falso-positivos devido à contaminação por produto de PCR e presença de inibidores de amplificação na amostra (Brasil, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em um serviço de extensão universitária.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar qual a combinação de dois métodos (triagem/confirmatório e confirmatório/confirmatório) apresentará a melhor reprodutibilidade no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2;
- Identificar qual a combinação de dois métodos (triagem/confirmatório e confirmatório/confirmatório) apresentará a menor proporção de discordância no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2;
- Identificar o método molecular com a melhor sensibilidade e especificidade no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL E ASPECTOS ÉTICOS

4.1.1 População de estudo

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e analítico. Durante o período de 2015 a 2017 foi realizado um levantamento dos indivíduos atendidos no Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBMC) do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), que realizaram o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 através do método de triagem (ELISA) e confirmatório (*nested-PCR*).

A população de estudo foi determinada a partir do cálculo do tamanho amostral, considerando o número total (n=476) de indivíduos atendidos durante o período estudado, margem de erro de 5%, ao nível de confiança de 95%, resultando em um número final de 208 indivíduos.

A demanda desses indivíduos procede de encaminhamentos da Fundação HEMOPA (reagentes na triagem sorológica), serviços especializados por apresentarem sintomas pertinentes e doenças associadas ao vírus, busca ativa em comunicantes, demanda espontânea, estudantes, gestantes, entre outros.

Os critérios de inclusão adotados foram indivíduos de ambos os sexos e de todas as idades, atendidos no LBMC/NMT/UFPA durante o período citado, e os que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Apêndice B). Foram excluídos do estudo indivíduos que possuíam amostras insuficientes para as análises laboratoriais.

4.1.2 Aspectos éticos

O presente estudo faz parte do projeto “Pesquisando infecções e doenças infecciosas na extensão universitária”, o qual foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA), por meio da Plataforma Brasil, obedecendo à Resolução nº 466 / 2012 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa

(CAAE: 38202214.60000.5172), número do parecer: 1.218.417, de 08 de setembro de 2015 (Anexo A). Todos os participantes foram orientados acerca dos objetivos do trabalho, sendo que, aqueles que concordaram em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que contemplou os objetivos da pesquisa, os seus métodos, os riscos e os benefícios (Apêndice B).

4.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Foram realizadas etapas de sorologia (pesquisa de anticorpos anti-HTLV) e de biologia molecular (detecção do DNA proviral). As etapas de sorologia (ELISA) e detecção do DNA proviral por PCR convencional (*nested*-PCR) foram executadas no LBMC/NMT/UFPA. A qPCR foi realizada em parceria com o Laboratório de Retrovírus da seção de virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC) e a qPCR multiplex foi realizada em parceria com o Hemocentro de Ribeirão Preto (SP).

4.2.1 Coleta e processamento do material biológico

O sangue foi coletado por punção venosa (aproximadamente 5mL) em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. Após isso, retirou-se o plasma transferindo-o para microtubos (2,0 ml) para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2. A camada de leucócitos (células mononucleadas do sangue periférico - PBMC) também foi retirada e transferida para outro microtubo para a extração de DNA. As alíquotas permaneceram congeladas a -20°C até a etapa de análise.

4.2.2 Sorologia (pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2)

As amostras de plasma foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-HTLV por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o Kit Gold ELISA Anti-HTLV-1/2 (REM, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras reativas com valores 20% abaixo ou acima do *cut off* (casos suspeitos) passaram por um novo teste imunoenzimático e pesquisa de DNA proviral.

4.2.3 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada a partir da camada de células leucocitárias (300 µL) utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), conforme as recomendações do fabricante.

4.2.4 Amplificação do gene da β globina humana (controle interno da reação)

A amplificação do gene da β globina humana foi realizada para avaliação da integridade do DNA extraído, utilizando-se os oligonucleotídeos G73 (5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (GREER *et al.*, 1991).

4.2.5 Amplificação da região pX do HTLV

Após a primeira etapa de amplificação do DNA proviral, foi realizada uma reação de *nested-PCR*, seguida de digestão enzimática, para confirmação da infecção e diferenciação dos tipos 1 e 2 de HTLV. Para isso, foi amplificada a região pX do vírus. Para a reação da 1ª etapa da PCR foi utilizada uma solução com 5,0 µL de *Go Taq Green Master Mix*, 2,0 µL de água, 1 µL (10 pmol) de cada iniciador HTLV_Externo F 5'-TTCCCAGGGTTTGGACGAAG-3' (7219-7238, direto) e HTLV_Externo R 5'-GGGTAAG GACCTTGAGGGTC-3' (7483-7464, reverso) e 1,0 µL de DNA, para um volume final de 10 µL. O protocolo de amplificação seguiu 35 ciclos (repetições), com temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento de 51,6°C por 30 segundos e a temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos, seguido da temperatura de extensão final a 72°C, por 10 minutos, e 10°C por 10 minutos (TUKE *et al.*, 1992).

A identificação molecular do genoma viral foi realizada por uma *Nested-PCR*, onde foram utilizadas as mesmas quantidades de *Go Taq Green Master Mix*, 1µL (10 pmol) de cada oligonucleotídeo, HTLV_interno F 5'CGGATACCCAGTCTACGTGTT3' (7248-7268, direto) e HTLV_interno R 5'GAGCCGATAACGCGTCCATCG3' (7406-7386, reverso), 2,5 µL de água e 0,5 µL

do produto da primeira PCR, gerando um fragmento de 159 pb. O protocolo de amplificação seguiu 35 ciclos (repetições), com temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento de 51,6°C por 30 segundos e a temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos, seguido da temperatura de extensão final a 72°C, por 10 minutos, e 10°C por 10 minutos (TUKE *et al.*, 1992).

Foram utilizados os controles positivos (amostra sabidamente positiva) e negativo (amostra negativa) em cada reação de PCR. Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/60 minutos) em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – Tris-Base 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com luz ultravioleta.

4.2.6 Digestão enzimática para caracterização do tipo de HTLV

Após a identificação dos casos com resultados de PCR positivos, através do gel de agarose a 2%, foi realizada a restrição enzimática (RFLP - polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) do produto amplificado, para identificar o tipo de HTLV-1/2 presente nas amostras.

A reação de RFLP do produto do gene *pX* (159pb) foi realizada misturando-se 6,0 µL do produto amplificado, 7 µL de H₂O, 1,5 µL de tampão E (Promega, Madison WI, USA) e 0,5 µL da enzima de restrição *Taq I* (10 U/µL, Promega, Madison WI, USA), com posterior incubação a 65°C por 2 horas. A presença do sítio de restrição (T/CGA), gera dois fragmentos (85 pb e 53 pb), este sítio encontra-se presente no HTLV-2, porém, ausente no HTLV-1.

Os produtos de digestão enzimática foram visualizados em gel de agarose de 3% a 100 V durante 60 minutos em tampão TAE 1x (TAE 49x estoque-Tris Base 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 Mm/1000 ml de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com luz ultravioleta.

4.2.7 Detecção do DNA proviral por PCR em tempo real (qPCR)

A PCR em Tempo Real foi realizada pelo sistema *TaqMan*® (*Applied Biosystems* Foster City, CA) de três sequências alvo: o gene da β -globina, como controle endógeno utilizando o ensaio (Assay ID): Hs00758889_S1, concentração de 20x (suficiente para 360 reações) e marcação da sonda VIC/MGB-NFQ (*Part Number* 4448489) e as regiões não homólogas do gene *pol* do HTLV-1 e do HTLV-2. *Primers* e sondas foram desenhados e sintetizados pelo serviço *Assay-by-Design*SM (*Part Number* 4304437) a partir de sequências de interesse enviadas à *Applied Biosystems* (Tamegão-Lopes *et al.*, 2006).

As reações da PCR foram preparadas utilizando o conjunto de reagentes *TaqMan Universal PCR Master Mix*, de acordo com instruções do fabricante. O protocolo da reação utilizou 10 μ L de *Master Mix*, 6,15 μ L de água e 0,85 μ L de *Assay-by-Design* (conjunto de *primer* e sonda), 3 μ L de DNA, sendo 20 μ L o volume final. Foi utilizado o seguinte protocolo de ciclagem: um ciclo de 50°C durante 2 minutos; um ciclo de 95°C durante 10 minutos; 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto (Tamegão-Lopes *et al.*, 2006). Na tabela 1 estão descritas a sequência nucleotídica dos primers e sondas utilizadas para a detecção de HTLV-1, HTLV-2 e β -globina humana.

Tabela 1: Sequência dos *primers* e sondas utilizadas para a detecção de HTLV-1, HTLV-2 e β -globina humana.

Primer e sonda	Sequência (5'-3')
HTLV-1 F	GAACGCTCTAATGGCATTCTTAAAACC
HTLV-1 R	GTGGTTGATTGTCCATAGGGCTAT
Sonda HTLV-1	FAM-ACAAACCCGACCTACCC-NFQ
HTLV-2 F	CAACCCACCAGCTCAGG
HTLV-2 R	GGGAAGGTTAGGACAGTCTAGTAGATA
Sonda HTLV-2	FAM-TCGAGAGAACCAATGGTATAAT-NFQ

4.2.8 Detecção do DNA proviral por PCR multiplex em tempo real (qPCR multiplex)

Para cada reação de PCR multiplex em tempo real com volume final de 25 μ L foram utilizados 7,5 μ L de um mix de primers + sondas, 12,5 μ L de *GoTaq® Probe qPCR Master Mix (2x)* (Promega) adicionado de ROX dye (Thermofisher Scientific) e 5 μ L de DNA extraído das amostras a serem analisadas. O mix de primers + sondas foi composto por 2,5 μ L de água, 0,5 μ L de cada primer *forward* e *reverse* específico para o gene da β -globina humana e diferentes regiões *pol* do HTLV-1 e HTLV-2, bem como 0,5 μ L das sondas FAM, VIC e NED para HTLV-1, HTLV-2 e β -globina humana, respectivamente. A concentração dos primers e das sondas variou de 200 a 500 nM, juntamente com a sequência dos primers utilizados. Quanto às condições térmicas de ciclagem, foi realizado um passo inicial de ativação da reação a 50 °C por 2 minutos e uma primeira temperatura de desnaturação a 95 °C por 10 minutos. Em seguida, foram realizados 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto para etapas de desnaturação, anelamento, extensão e captura de sinal. Na tabela 2 estão descritas a sequência nucleotídica dos primers e sondas utilizadas para a detecção de HTLV-1, HTLV-2 e β -globina humana.

Tabela 2: Sequência dos *primers* e sondas utilizadas para a detecção de HTLV-1, HTLV-2 e β -globina humana.

Primer e sonda	Sequência
HTLV-1 F	CAGCCCCTTCACAGTCTCTACTG
HTLV-1 R	AGAAGGATTTAAATATATTTGGTCTCGG
Sonda HTLV-1	FAM-CCTTACAAAGGATACTGAT-MGB
HTLV-2 F	CAAGGTGATGTAACCCATTATAAGTACAA
*HTLV-2 R	AAC CGC ACC GGA GAA GGT
*HTLV-2 R	AGAAACCAGCTGTGAGACTATCAGC
Sonda HTLV-2	VIC-AAATACAAATACTGCCTCCACGT-MGB
Globina F	GGTGAGCCAGGCCATCAC
Globina R	GGTGAGCCAGGCCATCAC
Sonda Globina	NED-TGCTCGGTGCCTTT-MGB

*Foram usados dois *primers* reversos para o HTLV-2 para aumentar a sensibilidade do teste.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar a sensibilidade e especificidade entre os métodos foi utilizado o *screening test*. Foi definido o critério de positividade de acordo com o estabelecido pelo Ministério da Saúde. Dessa forma, considerou-se positivos para HTLV, os casos com sorologia reagente confirmados no mínimo por um método molecular, e, os casos com sorologia não reagente confirmados no mínimo por dois métodos moleculares.

Para determinar a reprodutibilidade entre dois métodos foi utilizado o teste *Kappa*. A escala de reprodutibilidade adotada foi de acordo com a classificação de Bernard Rosner (2006): $k > 75$ (excelente reprodutibilidade), $4 \leq \kappa \leq 75$ (boa reprodutibilidade) e $0 \leq \kappa < 4$ (baixa reprodutibilidade).

Para identificar se houve discordância entre dois métodos foi utilizado o teste *McNemar*. A normalidade foi verificada utilizando o teste de *Lilliefors* para determinar a média da idade dos indivíduos. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa Bioestat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007), adotando um $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

No total, 208 amostras testadas para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1/2 através do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2 e confirmação por *nested*-PCR foram incluídas no estudo. Os resultados dessa metodologia foram comparados com os resultados de dois métodos moleculares de PCR em tempo real (qPCR e qPCR multiplex).

Quanto às características de gênero e idade de todos os indivíduos, 135 (64,9%) pertenciam ao gênero feminino e 73 (35,0%) ao gênero masculino. A idade média foi de 43,2 anos ($DP \pm 16,2$), sendo a idade mínima de 1 e a máxima de 81 anos. A seguir, estão descritos os resultados concordantes e discordantes obtidos na combinação de dois métodos de diagnóstico.

- **ELISA / *nested*-PCR:** 56 amostras positivas (49 HTLV-1 e 7 HTLV-2), 124 negativas e 28 discordantes, sendo 24 ELISA reagente/PCR negativa e 4 ELISA não reagente/PCR positiva.

- **ELISA / qPCR:** 55 amostras positivas (50 HTLV-1, 4 HTLV-2 e 1 dupla infecção HTLV-1 e HTLV-2), 120 negativas e 33 discordantes, sendo 25 ELISA reagente/PCR negativa e 8 ELISA não reagente/PCR positiva.

- **ELISA / qPCR multiplex:** 56 amostras positivas (51 HTLV-1 e 5 HTLV-2), 123 negativas e 29 discordantes, sendo 24 ELISA reagente/PCR negativa e 5 ELISA não reagente/PCR positiva.

- ***nested*-PCR / qPCR:** 55 amostras positivas (49 HTLV-1, 5 HTLV-2 e 1 dupla infecção HTLV-1 e HTLV-2), 140 negativos e 13 discordantes, sendo 5 *nested*-PCR positiva / qPCR negativa e 8 *nested*-PCR negativa / qPCR positiva.

- ***nested*-PCR / qPCR multiplex:** 53 amostras positivas (47 HTLV-1 e 6 HTLV-2), 140 negativas e 15 discordantes, sendo 7 *nested*-PCR positiva / qPCR multiplex negativa e 8 *nested*-PCR negativa / qPCR multiplex positiva.

- **qPCR / qPCR multiplex:** 56 amostras positivas (51 HTLV-1, 4 HTLV-2 e 1 dupla infecção HTLV-1 e HTLV-2), 140 negativas e 12 discordantes, sendo 7

qPCR positiva / qPCR multiplex negativa e 5 qPCR negativa / qPCR multiplex positiva.

Em seguida, determinou-se a reprodutibilidade e a concordância entre dois métodos testados para HTLV-1 e HTLV-2. As combinações entre os métodos moleculares apresentaram excelente reprodutibilidade. Os métodos *nested*-PCR / qPCR e qPCR / qPCR multiplex foram os que apresentaram os maiores e também iguais valores de concordância (0,94). Nas combinações entre o método ELISA com outro método molecular, observou-se que apresentaram boa reprodutibilidade. Dentre eles, destacou-se a combinação ELISA/*nested*-PCR com a maior concordância (0,87). A combinação ELISA/qPCR apresentou a menor concordância de todas (0,84) (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da reprodutibilidade dos resultados entre dois métodos testados para HTLV-1 e HTLV-2.

Métodos	Concordância	Kappa	Reprodutibilidade*
ELISA / <i>nested</i> -PCR	0,87	0,70	Boa
ELISA / qPCR	0,84	0,65	Boa
ELISA / qPCR multiplex	0,86	0,69	Boa
<i>nested</i> -PCR / qPCR	0,94	0,85	Excelente
<i>nested</i> -PCR / qPCR multiplex	0,93	0,83	Excelente
qPCR / qPCR multiplex	0,94	0,86	Excelente

*Classificação segundo Bernard Rosner (2006).

Avaliou-se também o grau de discordância entre dois métodos testados para HTLV-1 e HTLV-2. As combinações entre o método ELISA com outro método molecular apresentaram discordância significativa. Observou-se que a combinação ELISA/*nested*-PCR apresentou a menor proporção 13,5% (28/208) de casos discordantes. As combinações entre dois métodos moleculares não apresentaram discordância significativa. Mas, dentre eles a combinação entre qPCR / qPCR multiplex apresentou a menor proporção 5,8% (12/208) de casos discordantes.

Dentre as combinações entre a *nested*-PCR e um método de PCR em tempo real, a combinação que apresentou a menor proporção foi a *nested*-PCR / qPCR 6,3% (13/208) (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação do grau de discordância entre dois métodos testados para HTLV-1 e HTLV-2.

Métodos	Discordância	Proporção (%)
ELISA / <i>nested</i> -PCR	*p= 0,0003	13,5% (28/208)
ELISA / qPCR	*p= 0,005	15,9% (33/208)
ELISA / qPCR multiplex	*p= 0,0008	13,9% (29/208)
<i>nested</i> -PCR / qPCR	*p= 0,5811	6,3% (13/208)
<i>nested</i> -PCR / qPCR multiplex	*p= 1,0000	7,2% (15/208)
qPCR / qPCR multiplex	*p= 0,7744	5,8% (12/208)

*McNemar

Na tabela 5 encontram-se os resultados concordantes e discordantes nos métodos ELISA/*nested*-PCR frente aos métodos de PCR em tempo real (qPCR e qPCR multiplex) para HTLV-1 e HTLV-2.

Tabela 5: Resultados concordantes e discordantes nos métodos ELISA/*nested*-PCR frente aos métodos de PCR em tempo real (qPCR e qPCR multiplex) para HTLV-1 e HTLV-2

	ELISA (+) <i>nested</i> -PCR (-) n (%)	ELISA (-) <i>nested</i> -PCR (+) n (%)	ELISA (-) <i>nested</i> -PCR (-) n (%)	ELISA (+) <i>nested</i> -PCR (+) n (%)	Total
qPCR					
HTLV-1	4 (7)	3 (5,3)	4 (7)	46 (80,7)	57
HTLV-2	0	1 (20)	0	4 (80)	5
HTLV-1 e HTLV-2	0	0	0	1 (100)	1
Negativo	20 (13,8)	0	120 (82,8)	5 (3,4)	145
qPCR multiplex					
HTLV-1	5 (9,1)	1 (1,8)	3 (5,5)	46 (83,6)	55
HTLV-2	0	1 (16,7)	0	5 (83,3)	6
HTLV-1 e HTLV-2	0	0	0	0	0
Negativo	19 (12,9)	2 (1,4)	121 (82,3)	5 (3,4)	147
Total	24 (11,5)	4 (1,9)	124 (59,6)	56 (27)	208

(-) negativa; (+) positiva

Na avaliação da sensibilidade e especificidade (critério de positividade descrito em material e métodos) entre os métodos testados para 208 amostras, 67 foram consideradas verdadeiramente positivas e 141 verdadeiramente negativas.

- **ELISA:** 62 positivos, 123 negativos, 18 falso-positivos (ELISA positivo/PCR negativa) e 5 falso-negativos (ELISA negativo/PCR positiva em 2 métodos moleculares);

- **nested-PCR:** 60 positivos (52 HTLV-1 e 8 HTLV-2), 141 negativos e 7 falso-negativos;

- **qPCR:** 60 positivos (54 HTLV-1, 5 HTLV-2 e 1 dupla infecção HTLV-1 e HTLV-2), 138 negativos e 7 falso-negativos;

- **qPCR multiplex:** 59 positivos (53 HTLV-1 e 6 HTLV-2), 139 negativos e 8 falso-negativos.

Os resultados da sensibilidade e especificidade entre o método ELISA e métodos moleculares encontram-se na tabela 6. O método sorológico (ELISA) demonstrou maior sensibilidade em comparação aos métodos moleculares (*nested-PCR*, qPCR e qPCR multiplex). A *nested-PCR* e a qPCR demonstraram os maiores valores de sensibilidade entre os métodos moleculares. A *nested-PCR* apresentou 100% de especificidade e a qPCR multiplex demonstrou maior especificidade em relação a qPCR.

Tabela 6: Avaliação da sensibilidade e especificidade entre os métodos.

Método	Sensibilidade*	Especificidade*
ELISA	92,5%	87,2%
<i>nested-PCR</i>	89,6%	100,0%
qPCR	89,6%	97,9%
qPCR multiplex	88,0%	98,6%

*Resultado de acordo com o critério descrito em material e métodos.

As médias dos valores do Ct dos métodos de qPCR e qPCR multiplex foram determinadas para HTLV-1 e HTLV-2 e também na nested-PCR negativa e positiva. A qPCR multiplex apresentou a menor média dos valores do Ct, tanto pra HTLV-1 quanto pra HTLV-2. As médias dos valores do Ct para HTLV-2 foram maiores em ambos os métodos. Quando a nested-PCR foi negativa, a média dos valores do Ct foram maiores em ambos os métodos (Tabela 7).

Tabela 7: Médias dos valores do *cycle threshold* alvo (Ct) entre os métodos de qPCR e qPCR multiplex na detecção de HTLV-1 e HTLV-2.

	qPCR		qPCR multiplex	
Média	HTLV-1	HTLV-2	HTLV-1	HTLV-2
	34,01	35,14	32,72	34,16
	nested-PCR (-)		nested-PCR (+)	
Média	qPCR	qPCR multiplex	qPCR	qPCR multiplex
	39,25	38,25	33,46	32,05

(-) negativa; (+) positiva

6 DISCUSSÃO

As análises de concordância / reprodutibilidade e discordância mostraram que a combinação ELISA e *nested*-PCR apresentou mais resultados concordantes e menos resultados discordantes dentre aqueles que combinavam o ELISA com outro método molecular. A *nested*-PCR e a qPCR apresentaram a maior concordância dentre todos os métodos. Não houve discordância quando se comparou os métodos moleculares entre si.

O método ELISA apresentou a maior sensibilidade e a mais baixa especificidade. Resultado este esperado para testes de triagem, que geralmente, apresentam alta sensibilidade e baixa especificidade (Ishihara *et al.*, 2014). No entanto, no presente estudo verificou-se um número expressivo de resultados falso-positivos 29% (18/62).

Moreno *et al.* (2013) detectaram 100% de sensibilidade e 98,04% de especificidade no ELISA comparado com outros dois métodos sorológicos na triagem de HTLV em doadores de sangue. No entanto, após a confirmação pelo método de imunofluorescência indireta, verificaram 69% de falso-positivos. Estudos demonstraram que os kits imunoenzimáticos comerciais não são 100% sensíveis (Berini *et al.*, 2008; Caterino-de-Araujo *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2007; 2008; 2009). Resultados falso-positivos foram encontrados na triagem sorológica para HTLV-1/2 em doadores de sangue (Berini *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010).

Resultados falso-positivos no ELISA foram associados à infecção por outros retrovírus, ou ainda reação cruzada contra alguns agentes infecciosos e parasitários, por exemplo, o HIV, o coronavírus associado à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e a malária, endêmica na região amazônica brasileira (Brady *et al.*, 1987; Carvalho *et al.*, 2011; Caterino-de-Araujo *et al.*, 1998; Mahieux & Gessain, 2009; Poiez *et al.*, 2000; Tsao *et al.*, 2005; Vallinoto *et al.*, 2012). No entanto, neste estudo as amostras não foram testadas para outros agentes.

Resultados falso-negativos no ELISA também foram detectados. Dentre as amostras que apresentaram ausência de sororeatividade no ELISA, 5 foram positivas nos três métodos moleculares (*nested*-PCR, qPCR multiplex e qPCR), sendo 4 HTLV-1 e 1 HTLV-2.

A baixa sensibilidade do ELISA para detectar o HTLV-1 é mais preocupante, visto que é um método de triagem sorológica nos bancos de sangue. Assim, o impacto é muito maior no prognóstico da infecção pelo HTLV-1 do que pelo HTLV-2 (Carvalho *et al.*, 2011). A causa da baixa sensibilidade em detectar anticorpos anti-HTLV-2 foi sugerida pela longa persistência do vírus em latência, associada à baixa carga proviral, resultando na diminuição da concentração de anticorpos específicos, e também, a dificuldade dos testes imunoenzimáticos comerciais de detectar anticorpos contra uma variante do HTLV-2 (HTLV-2c) circulante no Brasil (Ishak *et al.*, 2007).

Campos *et al.* (2015) relataram diferenças na sensibilidade e especificidade entre o *Kit* Murex e o Gold ELISA, ambos *kits* comerciais de triagem da 3^o geração (peptídeos sintéticos e/ou proteínas recombinantes). O *Kit* Murex foi mais sensível (100%) e específico (99%) em comparação ao Gold ELISA, 98% e 100%, respectivamente.

A escolha do kit Gold ELISA como método de triagem é devido ser menos oneroso no serviço de extensão universitária, pois é um *kit* nacional. Ressaltando que o uso mesmo não causa nenhum prejuízo ao resultado do diagnóstico laboratorial do paciente.

Dentre os métodos moleculares, a *nested*-PCR e a qPCR foram mais sensíveis que a qPCR multiplex. O diferencial foi que a qPCR e a qPCR multiplex foram mais sensíveis para a detecção do HTLV-1 enquanto que a *nested*-PCR foi mais sensível para a detecção do HTLV-2.

Quanto à especificidade, a *nested*-PCR demonstrou 100% de especificidade. No entanto, verificou-se 7 (8,8%) falso-negativos na *nested*-PCR que positivaram nos métodos de PCR em tempo real (qPCR e qPCR multiplex). Dessa forma, os métodos de PCR em tempo real foram eficientes na resolução dos casos discordantes. Este achado corrobora ao de Arruda *et al.* (2008), pois também detectaram 100% de especificidade na PCR convencional. No entanto, verificaram mais de 10% de resultados falso-negativos e sugeriram a PCR em tempo real na identificação do vírus e na determinação simultânea da carga proviral.

O Ct indica o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência alvo presente no DNA. Assim, quanto menor o Ct maior a amplificação

do DNA da amostra. Na análise do Ct, as amostras que foram *nested-PCR* negativas apresentaram maiores médias dos valores do Ct em ambos os métodos de PCR em tempo real, sugerindo que elas possam ter baixa carga proviral e/ou baixo número de células infectadas, sendo detectadas apenas nos métodos de PCR em tempo real. As médias dos valores do Ct foram menores para o HTLV-1 em comparação com o HTLV-2 em ambos os métodos de PCR em tempo real, sugerindo que as amostras de HTLV-2 possam ter baixa carga proviral, e consequentemente obtiveram maiores valores do Ct. Estudos mostraram que resultados falso-negativos nos métodos de PCR foram associados à baixa carga proviral em portadores assintomáticos do HTLV-1/2 e em indivíduos com HTLV-2 (Arruda *et al.*, 2008; Canepa *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004; Montanheiro *et al.*, 2005, 2008; Murphy *et al.*, 2004; Watters *et al.*, 2011).

A qPCR apresentou maior sensibilidade que a qPCR multiplex, no entanto, as médias dos valores do Ct na qPCR multiplex foram menores que na qPCR, sugerindo que a qPCR multiplex tenha sido mais eficiente na detecção. No entanto, vale ressaltar que os reagentes e os aparelhos utilizados em cada método de PCR em tempo real foram diferentes, e que essas diferenças no Ct podem ser em decorrência de ajustes nos protocolos.

As 5 amostras que foram negativas no ELISA e na *nested-PCR*, mas que positivaram em ambos os métodos de PCR em tempo real não podem ser consideradas como falso-positivas, pois só podem ser esclarecidas talvez com o sequenciamento. Não se pode descartar também a hipótese de contaminação, pelo fato de que para a realização de cada método de PCR em tempo real foram separadas alíquotas de DNA a partir do tubo primário com o DNA extraído.

Em nosso estudo, um caso raro de dupla infecção (HTLV-1/HTLV-2) foi detectado apenas pela qPCR, enquanto que nos outros dois métodos moleculares (*nested-PCR* e qPCR multiplex) foi detectado apenas o HTLV-2. Por se tratar de um caso raro, essa dupla infecção provavelmente é mais fácil ser encontrada em um estudo com um grande tamanho amostral (Portela, 2008), diferentemente do nosso estudo.

Campos *et al.* (2017) investigaram 2.991 indivíduos com HIV-1 para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2. Dos 108 indivíduos detectados com HTLV, um indivíduo apresentou a dupla infecção (HTLV-1/HTLV-2) em três métodos de confirmação (WB, LIA e PCR em tempo real). Portela (2008) realizou um amplo estudo de triagem sorológica em 155.807 gestantes para diagnosticar a infecção pelo HTLV-1/2. Das 206 (0,13%) gestantes confirmadas com HTLV, uma gestante (0,4%) apresentou a dupla infecção (HTLV-1/HTLV-2).

Outros estudos que detectaram a dupla infecção (HTLV-1/HTLV-2) foram realizados na África, onde algumas regiões são endêmicas tanto para o HTLV-1 quanto para o HTLV-2. Fox *et al.* (2016) em um estudo em Malawi, realizaram a triagem sorológica em 418 mulheres e 534 crianças para investigar a transmissão vertical. De 11 mulheres e 12 crianças confirmadas com HTLV, uma mulher (0,2%) e duas crianças (0,4%) apresentaram a dupla infecção (HTLV-1/HTLV-2). Outros estudos mais antigos na Nigéria confirmaram a dupla infecção (HTLV-1/HTLV-2) em mulheres (2,2%), crianças (0,2%) e em profissionais do sexo (1,67%) (Olaleye *et al.*, 1994; 1995).

O presente estudo forneceu informações complementares a respeito do desempenho dos métodos imunoenzimático (ELISA), *nested*-PCR, qPCR e qPCR multiplex no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2. O método de *nested*-PCR combinado ao ELISA apresentou a maior reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e de baixo custo. No entanto, os métodos de PCR em tempo real foram eficientes na resolução dos casos discordantes. Assim, a *nested*-PCR apresentou excelente opção como método molecular de confirmação com o auxílio da qPCR nos casos discordantes frente ao ELISA no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1/2

Os dados obtidos no presente estudo fomentam a necessidade de mais estudos para um melhor esclarecimento acerca das diferenças na sensibilidade e especificidade entre os métodos sorológicos e moleculares no diagnóstico laboratorial dessa infecção.

7 CONCLUSÕES

- A combinação ELISA/*nested*-PCR apresentou mais resultados concordantes e menos resultados discordantes dentre aqueles que combinavam o ELISA com outro método molecular;
- A combinação *nested*-PCR/qPCR apresentou a maior concordância dentre todos os métodos;
- O método ELISA apresentou a maior sensibilidade;
- Dentre os métodos moleculares, a *nested*-PCR e a qPCR foram mais sensíveis;
- A *nested*-PCR foi mais sensível na detecção do HTLV-2, enquanto que os métodos de PCR em tempo real foram mais sensíveis para o HTLV-1;
- A *nested*-PCR apresentou a maior especificidade;
- Os métodos de PCR em tempo real foram eficientes na resolução dos casos discordantes;
- A *nested*-PCR se mostrou como excelente estratégia como método de confirmação da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, com o auxílio da qPCR nos casos discordantes frente ao ELISA.

8 REFERÊNCIAS

- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília, CNPq, 2007. 364 p.
- AGUIAR, A. A., FRANÇA, S. A. S. F., SANTANA, B. B., SANTOS, M. B., FREITAS, F. B., FERREIRA, G., CAYRES-VALLINOTO, I., ISHAK, M. O. G., ISHAK, R., VALLINOTO, A. C. R. Human T-lymphotropic virus 1aA circulation and risk factors for sexually transmitted infections in an Amazon geographic area with lowest human development index (Marajó Island, Northern Brazil). **BMC Infectious Diseases 17** (1): 2017.
- ALTAMIRANO, N. A., ROCCO, C., AULICINO, P. SEN, L., MANGANO, A. Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: Comparison of two methods for DNA isolation. **Journal of Virological Methods 170** (1-2): 160-4, 2010.
- ANDRADE, R. G., RIBEIRO M. P., NAMEN-LOPES M. S. S., SILVA, S. M. N., BASQUES, F. V., RIBAS, J. G., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F., MARTINS, M. L. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43** (2): 111-115, 2010.
- ARRUDA, B. C., LIRA, R. A., LOUREIRO, P. BRANDÃO, L., SOUZA, P., GOMES, Y. M. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in patients in the Hematologia da Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 30** (5): 384-389, 2008.
- BERINI, C. A., SUSANA PASCUCIO, M., BAUTISTA C. T., GENDLER S. A., EIRINI, M. E., RODRIGUEZ, C., PANDO, M. A., BIGLIONE, M. M. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. **Journal of Virological Methods 147**: 322-7, 2008.

- BITTENCOURT, A. L., DOURADO, I., FILHO, P. B., SANTOS, M., VALADÃO, E., ALCANTARA, L. C., GALVÃO-CASTRO, B. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes** **26** (5): 490-4, 2001.
- BRADY, J., JEANG, K. T., DUVALL, J., KHOURY, G. Identification of p4Ox-Responsive Regulatory Sequences within the Human T-Cell Leukemia Virus Type I Long Terminal Repeat. **Journal of Virology** **61** (7): 2175-81, 1987.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. **Guia de manejo clínico do paciente com HTLV**, Brasília, 41p., 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia do manejo clínico da infecção pelo HTLV**. Brasília: Ministério da Saúde, 80 p., 2013.
- CALATTINI, S., CHEVALIER, S. A., DUPREZ, R., BASSOT, S., FROMENT, A., MAHIEUX, R., GESSAIN, A. Discovery of a new Human T-cell Lymphotropic Virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology** **2**: 30, 2005.
- CAMPOS, K. R., GONÇALVES, M. G., FUKASAWA, L. O., COSTA, N. P. BARRETO-DAMIÃO, C. H., MAGRI, M. C. ALENCAR, W. K., CATERINO-DE-ARAUJO, A. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** **74** (1): 57-65, 2015.
- CAMPOS, K. R., GONÇALVES, M. G., COSTA, N. P., CATERINO-DE-ARAUJO, A. Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases** **21** (3): 297-305, 2017.
- 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** **7**, 5643-5658, 2015.

- CARVALHO, F. T., SANTOS, A. B., SILVA, R. S. U., ISHAK, R., VALLINOTO, A. C. R. Diagnóstico sorológico de infecção por human lymphotropic cell-t vírus types 1 and 2 (HTLV) em pacientes com malária. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI 4 (2):** 63-67, 2011.
- CASSAR, O. & GESSAIN, A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. **Methods in Molecular Biology 1582:** 3-24, 2017.
- CATALAN-SOARES, B., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F., PROIETTI, F. A. 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. **Cadernos de Saúde Pública 21 (3):** 926-931, 2005.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A., SANTOS-FORTUNA, E., MELEIRO, M. C. SULEIMAN, J., CALABRO, M. L., FAVERO, A., DE ROSSI, A., CHIECO-BIANCHI, L. Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay tests in relation to western blot in detecting human T-cell lymphotropic virus types I and II infection among HIV-1 infected patients from São Paulo, Brasil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 30 (3):** 173-82, 1998.
- CHEN, Y. A., OKAYAMA, A., LEE, T., TACHIBANA, N., MUELLER, N., ESSEX, M. Sexual transmission of human T-cell leukemia virus type I associated with the presence of anti-Tax antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:** 1182-1186, 1991.
- COFFIN, J. M. Retroviridae. In: **Fundamental Retrovirology. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L. Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.) Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. p. 763 – 843.**
- COSTA, E. A. S., MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. **Journal of Virological Methods 173 (2):** 280–286, 2011.
- COSTA, C. A., FURTADO, K. C. Y. O., FERREIRA, L. S. C. F., ALMEIDA, D. S., LINHARES, A. C. L., ISHAK, R., VALLINOTO, A. C. R., LEMOS, J. A. R.,

- MARTINS, L. C., ISHIKAWA, E. A. Y., SOUSA, R. C. M., SOUSA, M. S. Familial Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus: Silent Dissemination of an Emerging but Neglected Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 7 (6): 2013.
- COSTA, J. M. P. & SEGURADO, A. C. 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. **Journal of Clinical Virology** 44: 185–189, 2009.
- DEHÉE, A., CÉSAIRE, R., DÉsirÉ, N., LÉZIN, A., BOURDONNÉ, O., BÉRA, O., PLUMELLE, Y., SMADJA, D., NICOLAS, J. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods** 102: 37–51, 2002.
- DOURADO, I., ALCANTARA, L. C. J., BARRETO, M. L., TEIXEIRA, M. G., GALVAÃO-CASTRO, B. HTLV- I in the General Population of Salvador, Brazil A City With African Ethnic and Sociodemographic Characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes** 34 (5): 527-31, 2003.
- DUNN, B. M., GOODENOW, M. M., GUSTCHINA, A., WLODAWER, A. Retroviral proteases. **Genome Biology** 3 (4): 2002.
- ESTES, M.C., SEVALL, J.S. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantification of HTLV I or II. **Mol Cell Probes** 17: 59-68, 2003.
- FELBER, B. K., PASKALIS, H., KLEINMAN-EWING, C., PAVLAKIS, G. N., The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. **Science** 229 (4714): 675-9, 1985.
- FERREIRA, L. S. C., COSTA, J. H. G., COSTA, C. A., MELO, M. F. C., ANDRADE, M. L., MARTINS, L. C., ISHIKAWA, E. A. Y., SOUSA, M. S. Soroprevalência do vírus linfotrópico de células T humanas em comunidades ribeirinhas da região nordeste do Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** 1 (3): 103-108, 2010.

- FEUER, G. & GREEN, P. L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene** **24** (39): 5996–6004, 2005.
- FOX, J. M., MUTALIMA, N., MOLYNEUX, E., CARPENTER, L. M., TAYLOR, G. P., BLAND, M., NEWTON, R., MARTIN, F. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 amongst mothers and children in Malawi within the context of a systematic review and meta-analysis of HTLV seroprevalence in Africa. **Tropical Medicine and International Health** **21** (3): 312-324, 2016.
- FURTADO, M. S. B., ANDRADE, R. G., ROMANELLI, L. C. F., RIBEIRO, M. A., RIBAS, J. G., TORRES, E. B., BARBOSA-STANCIOLI, E. F., PROIETTI, A. B. F. C., MARTINS, M. L. Monitoring the HTLV-1 Proviral Load in the Peripheral Blood of Asymptomatic Carriers and Patients With HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis From a Brazilian Cohort: ROC Curve Analysis to Establish the Threshold for Risk Disease. **Journal of Medical Virology** **84**: 664-671, 2012.
- GALVÃO-CASTRO, B., LOURES, L., RODRIQUES, L. G. M., SERENO, A., FERREIRA, J. O. C., FRANCO, L. G., MULLER, M., SAMPAIO, D. A., SANTANA, A., PASSOS, L. M., PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion** **37** (2): 242-3, 1997.
- GESSAIN, A., VERNANT, J. C., MAURS, L., BARIN, F., GOUT, O., CALENDER, A. Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Type-1 in patients with Tropical Spastic Paraparesis. **The Lancet** **2** (8452): 407-10, 1985.
- GESSAIN, A. & CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology** **3** (388): 2012.
- GHEZ, D., LEPELLETIER, Y., LAMBERT, S., FOURNEAU, J., BLOT, V., JANVIER, S., ARNULF, B., ENDERT, P. M., HEVEKER, N., PIQUE, C., HERMINE, O. Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. **Journal of Virology** **80** (14): 6844-6854, 2006.
- GIAM, C., & SEMMES, O. J. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. **Viruses** **8** (6): 2016.

- GONÇALVES, D. U., PROIETTI, F. A., RIBAS, J. G. R., ARAÚJO, M. G., PINHEIRO, S. R., GUEDES, A. C., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Associated Diseases. **Clinical Microbiology Reviews** **23** (3): 577-589, 2010.
- HINO, S., YAMAGUCHI, K., KATAMINE, S., SUGIYAMA, H., AMAGASAKI, T., KINOSHITA, K., YOSHIDA, Y., DOI, H., TSUJI, Y., MIYAMOTO, T. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I. **Japanese Journal of Cancer Research (Gann)** **76**: 474-480, 1985.
- HLELA, C., SHEPPERD, S., KHUMALO, N. P., TAYLOR, G. P. The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. **AIDS Reviews** **11** (4): 205-14, 2009.
- ISHAK, R., HARRINGTON JR., W. J., AZEVEDO, V. N., EIRAKU, N., ISHAK, M. O. G., GURREIRO, J. F., SANTOS, S. E. B., KUBO, T., MONKE, C., ALEXANDER, S., HALL, W. W. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses** **11**: 813-821, 1995.
- ISHAK, R., VALLINOTO, A. C., AZEVEDO, V. N., LEWIS, M., HALL, W. W., ISHAK, M. O. G. Molecular Evidence of mother to child Transmission of HTLV-IIc in the Kararao village in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **35**: 519 – 525, 2001.
- ISHAK, R., VALLINOTO, A. C. R, AZEVEDO, V. N, VICENTE, A. C. P, HALL, W. W., ISHAK, M. O. G. Molecular evidence for infection by HTLV-2among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. **Epidemiology and Infection** **135**: 604-9, 2007.
- ISHIHARA, K., INOKUCHI, N., TSUSHIMA, Y., TSURUDA, K., MORINAGA, Y., HASEGAWA, H., YANAGIHARA, K., KAMIHIRA, S. Relevance of molecular tests for HTLV-1 infection as confirmatory tests after the first seroscreening. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry** **35** (1) 74-82, 2014.

- JACOB, F., SANTOS-FORTUNA, E., AZEVEDO, R. S., CATERINO-DE-ARAUJO, A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo** **49**: 361-4.28, 2007.
- JACOB, F., SANTOS-FORTUNA, E., AZEVEDO, R. S., CATERINO-DE-ARAUJO, A. Serological patterns for HTLV-I/II and its temporal trend in high-risk populations attended at Public Health Units of São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Virology** **42**: 149-55, 2008.
- JACOB, F., MAGRI, M. C., COSTA, E. A. S., 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. **Journal of Virological Methods** **159**: 288-90, 2009.
- JONES, K. S., PETROW-SADOWSKI, C., BERTOLETTE, D. C., HUANG, Y., RUSCETTI, F. W. Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into CD4⁺ T Cells. **Journal of Virology** **79** (20): 12692-12702, 2005.
- KAJIYAMA, W., KASHIWAGI, S., IKEMATSU, H., HAYASHI, J., NOMURA, H., OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. **The Journal of Infectious Diseases** **154** (5): 851-7, 1986.
- KALYANARAMAN, V. S., SARNGADHARAN, M. G., MIYOSHI, I., BLAYNEY, D., GOLDE, D., GALLO, R. C. A new subtype of Human T-cell Leukemia Virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science** **218** (4572): 571-3, 1982.
- KAMIHIRA, S., DATEKI, N., SUGAHARA, K., HAYASHI, T., HARASAWA, H., MINAMI, S., HIRAKATA, Y., YAMADA, Y. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. **International Journal of Laboratory Hematology** **25** (2): 111-117, 2003.
- KANNAGI, M., OHASHI, T., HARASHIMA, N., HANABUCHI, S., HASEGAWA, A. Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. **Trends in Microbiology** **12** (7): 346-52, 2004.

- KAPLAN, J. E., OSAME, M., KUBOTA, H., IGATA, A., NISHITANI, H., MAEDA, Y., KHABBAZ, R. F., JANSSEN, R. S. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes** **3** (11): 1096-101, 1990.
- KINOSHITA, K., AMAGASAKI, T., HINO, S., DOI, H., YAMANOUCHI, K., BAN, N., MOMITA, S., IKEDA, S., KAMIHIRA, S., ICHIMARU, M., KATAMINE, S., MIYAMOTO, T., TSUJI, Y., ISHIMARU, T., YAMABE, T., ITO, M., KAMURA, S., TSUDA, T. Milk-borne transmission of HTLV-I from carrier mothers to their children. **Japanese Journal of Cancer Research** **78** (7): 674-80, 1987.
- LAGRENADE, L., HANCHARD, B., FLETCHER, V., CRANSTON, B., BLATTNER, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **The Lancet** **336**: 1345-47, 1990.
- LAROCQUE, E., HALIN, M., LANDRY, S., MARRIOTT, S. J., SWITZER, W. M., BARBEAU, B. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3 (HTLV-3) and HTLV-4 Derived Antisense Transcripts Encode Proteins with Similar Tax-Inhibiting Functions but Distinct Subcellular Localization. **Journal of Virology** **85** (23): 12673-12685, 2011.
- LE BLANC, I., GRANGE, M. P., DELAMARRE, L., ROSENBERG, A. R., BLOT, V., PIQUE, C., DOKHÉLAR, M. C. HTLV-1 structural proteins. **Virus Research** **78** (1-2): 5-16, 2001.
- LEE, T., CHAFETS, D. M., BUSCH, M. P., MURPHYA, E. L. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Clinical Virology** **31**: 275-282, 2004.
- MAEDA, Y., TERASAWA, H., TANAKA, Y., MITSUURA, C., KAOR, N., NAKASHIMA, K., YUSA, K., HARADA, S. Separate Cellular Localizations of Human T-Lymphotropic Virus 1 (HTLV-1) Env and Glucose Transporter Type 1 (GLUT1) Are Required for HTLV-1 Env-Mediated Fusion and Infection. **Journal of Virology** **89** (1): 502-11, 2015.

- MANEL, N., KIM, F. J., KINET, S., TAYLOR, N., SITBON, M., BATTINI, J. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. **Cell** **115**: 449-459, 2003.
- MAGNO FALCÃO, L. F., FUZII, H. T., LIBONATI, R. M. F., AARÃO, T. L. F., GUIMARÃES, A. G. M., MARTINS, L. C., QUARESMA, J. A. S. Environmental Impact and Seroepidemiology of HTLV in Two Communities in the Eastern Brazilian Amazon. **Journal of Medical Virology** **85**: 1585-1590, 2013.
- MAHIEUX, R., GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. **Pathologic Biology** **57** (2):161-166, 2009.
- MARTIN, F., TAYLOR, G. P., JACOBSON, S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. **Expert Review of Clinical Immunology** **10** (11): 1531-1546, 2014.
- MARTINS, M. L., SANTOS, A. C., NAMEN-LOPES, M. S., BARBOSA-STANCIOLIEF, UTSCH, D. G., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. Long-term serological follow up of blood donors with an HTLV-indeterminate Western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. *Journal of Medical Virology* **82**:1746–53, 2010.
- MILEY, W. J., SURYANARAYANA, K., MANNS, A., KUBOTA, R., JACOBSON, S., LIFSON, J. D., WATERS, D. Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Cell-Associated HTLV Type I DNA Viral Load. **AIDS Research and Human Retroviruses** **16** (7): 665-75, 2000.
- MOCHIZUKI, M., YAMAGUCHI, K., TAKATSUKI, K., WATANABE, T., MORI, S., TAJIMA, K. HTLV-I and uveitis: distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Japanese Journal of Cancer Research** **83** (3): 236-39, 1992.
- MONTANHEIRO, P. A., OLIVEIRA, A. C., POSADA-VERGARA, M. P., MILAGRES, A. C., TAUIL, C., MARCHIORI, P. E., DUARTE, A. J. S., CASSEB, J. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-II-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **28**, 1643-1647, 2005.

- MONTANHEIRO, P. A., OLAH, I., FUKUMORI, L. M. I., SMID, J., PENALVA DE OLIVEIRA, A. C., KANZAKI, L. I. B., FONSECA, L. A. M., DUARTE, A. J. S., CASSEB, J. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo city. **Virus Research** **135**, 22–25, 2008.
- MORENO, C., BALANGERO, M., BARBÁS, M. G., CUDOLÁ, A., GALLEGO, S. Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir el estatus serológico en donantes de sangre. **Revista Argentina de Microbiología** **45** (3): 165-168, 2013.
- MURPHY, E. L., FIGUEROA, J. P., GIBBS, W. N., BRATHWAITE, A., HOLDING-COBHAM, M., WATERS, D., CRANSTON, B., HANCHARD, B., BLATTNER, W. A. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Annals of Internal Medicine** **111** (7): 555-60, 1989.
- MURPHY, E. L., LEE, T. H., CHAFETS, D., NASS, C. C., WANG, B., LOUGHLIN, K., SMITH, D., For the HTLV outcomes study investigators. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLVII subtype A versus B, and with male sex and history of blood transfusion. **The Journal of Infectious Diseases** **190**: 504-510, 2004.
- NASCIMENTO, S., SUAREZ, E. R., PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **RBM Revista Brasileira de Medicina** **67**, 2010.
- NUNES, D., BOA-SORTE, N., GRASSI, M. F. R., TAYLOR, G. P., TEIXEIRA, M. G., BARRETO, M. L., DOURADO, I., GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. **PLoS One** **12** (2): 2017.
- OHSHIMA, K. Molecular Pathology of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. **Oncology** **89**: 7-15, 2015.
- OKOCHI, K., SATO, H., HINUMA, Y. A Retrospective Study on Transmission of Adult T Cell Leukemia Virus by Blood Transfusion: Seroconversion in Recipients. **Vox Sanguinis** **46**: 245-253, 1984.

- OLINDO, S., LÉZIN, A., CABRE, P., MERLE, H., SAINT-VIL, M., KAPTUE, M. E., SIGNATE, A., CÉSAIRE, R., SMADJA, D. **Journal of the Neurological Sciences** **237**: 53-59, 2005.
- OSAME, M., USUKU, K., IZUMO, S., IJICHI, N., AMITANI, H., IGATA, A., MATSUMOTO, M., TARA, M. HTLV-I Associated Myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet** **1** (8488): 1031-2, 1986.
- OLALEYE, D. O., BERNSTEIN, L., SHENG, Z., EKWEOZOR, C. C., LI, X. Y., SULLIVAN-HALLEY, J., RASHEED, S. Type-specific immune response to human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I and type II infections in Nigeria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **50**: 479-486, 1994.
- OLALEYE, D. O., EKWEOZOR, C. C., SHENG, Z., RASHEED, S. Evidence of serological cross-reactivities with human immunodeficiency virus types 1 and 2 and human T-lymphotropic virus types I and II in sera of pregnant women in Ibadan, Nigeria. **International Journal of Epidemiology** **24**: 198-203, 1995.
- PINHEIRO, S. R., MARTINS-FILHO, O. A., RIBAS, J. G., CATALAN-SOARES, B. C., PROIETTI, F. A., NAMEN-LOPES, S., BRITO-MELO, G. E., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. **American Journal of ophthalmology** **142** (5): 811-15, 2006.
- POIESZ, B. J., RUSCETTI, F. W., GAZDAR, A. F., BUNN, P. A., MINNA, J. D., GALLO, R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **77** (12): 7415–7419, 1980.
- POIESZ, B. J., DUBE, S., CHOI, D., ESTEBAN, E., FERRER, J., LEON-PONTE, M., PEREZ, G. E., GLASER, J., DEVARE, S. G., VALARI, A. S. SHOCHETMAN, G. 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** **40** (8): 924-930, 2000.

- PORTELA, P. C. **Prevalência e diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus HTLV em gestantes de Mato Grosso do Sul, no período de 2002 a 2006.** Dissertação (Mestrado em ciências da saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Distrito Federal, p. 74. 2008.
- PROIETTI, A. B. F. C. Virus Linfotópicos de Células T Humanas Tipos 1 e 2 (HTLV-1/2) – Biologia, Epidemiologia, Diagnóstico, doenças associadas. In: **Cadernos Hemominas HTLV.** Proietti, A.B.F.C et al. (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- PROIETTI, F. A., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. C., CATALAN-SOARES, B. C., MURPHY, E. L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene 24** (39): 6058-68, 2005.
- REISS, D. B., FREITAS, G. S., BASTOS, R. H. C., SOUZA, M. A., Horiguchi, C. L. F., MARTINS, M. L., FERREIRA, A. S. D., STARLING, A. L. B., ROMANELLI, L. C. F., PROIETTI, A. B. F. C. Neurological outcomes analysis of HTLV-1 seropositive patients of the Interdisciplinary Research HTLV Group (GIPH) cohort, Brazil. **Retrovirology 11**: 2014.
- RESSLER, S., MORRIS, G. F. MARRIOTT, S. J. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Transactivates the Human Proliferating Cell Nuclear Antigen Promoter. **Journal of Virology 71** (2): 1181–1190, 1997.
- RIBEIRO, M. A., MARTINS, M. L., TEIXEIRA, C., LADEIRA, R., OLIVEIRA, M. F., JANUÁRIO, J. N., PROIETTI, F. A., CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Blocking Vertical Transmission of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 and 2 Through Breastfeeding Interruption. **The Pediatric Infectious Disease Journal 31** (11): 1139-43, 2012.
- ROBEK, M. D. & RATNER, L. Immortalization of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Mutants Expressed in a Functional Molecular Clone. **Journal of Virology 73** (6): 4856-4865, 1999.
- RODRÍGUEZ-ZÚNIGA, M. J. M., CORTEZ-FRANCO, F., QUIJANO-GOMERO, E. Adult T-cell leukemia/lymphoma in a Peruvian hospital in human T-lymphotropic

virus type 1 (HTLV-1) positive patients. **International Journal of Dermatology** **56** (5): 503-509, 2017.

ROMAN, G. C. & OSAME, M. Identity of HTLV-1 associated tropical Spastic paraparesis and HTLV-1 associated Myelopathy. **The Lancet** **1** (8586): 651, 1988.

ROSS, T. M., PETTIFORD, S. M., GREEN, P. L. The *tax* gene of Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 is essential for transformation of Human T Lymphocytes. **Journal of Virology** **70** (8): 5194-5202, 1996.

ROSNER, B. **Fundamentals of Biostatistics**. 6.ed. Boston: Duxbury Press , 2006.

ROUCOUX, D. F. & MURPHY, E. L. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. **AIDS Reviews** **6** (3): 144-54, 2004.

SAITO, M. & BANGHAM, C. R. M. Immunopathogenesis of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Recent Perspectives. **Leukemia Research and Treatment** **2012**: 2012.

SANTOS, E. L., TAMEGÃO-LOPES, B., MACHADO, L. F. A., ISHAK, M. O. G., ISHAK, R., LEMOS, J. A. R, VALLINOTO, A. C. R. Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região Amazônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **24** (3): 271-276, 2009.

SATOU, Y., YASUNAGA, J., YOSHIDA, M., MATSUOKA, M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **103** (3): 720-725, 2006.

SILVA, I. C. *et al.* Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrópico-T humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia** **21**, 2018.

SHIMOTOHNO, K., TAKAHASHI, Y., SHIMIZU, N., GOJOBORI, T., GOLDE, D. W., CHEN, I. S. Y., MIWA, M., SUGIMURA, T. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: An open reading frame

for the protease gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **82** (10): 3101-5, 1985.

SUGIMOTO, M., NAKASHIMA, H., WATANABE, S., UYAMA, E., TANAKA, F., ANDO, M., ARAKI, S., KAWASAKI, S. T-lymphocyte alveolitis in HTLV-I-associated myelopathy. **The Lancet** **2** (8569): 1220, 1987.

TAKATANI, M., CRISPIM, M. E., FRAIJI, N., STEFANI³, M. M. A., KIESSLICH, D. Clinical and laboratory features of HTLV-I asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis from the Brazilian Amazon. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine** **59**: 2017.

TAMEGÃO-LOPES, B. P., REZENDE, P. R., MARADEI-PEREIRA, L. M. C., LEMOS, J. A. R. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39** (6): 548-552, 2006.

TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: **HTLV, truths and questions**. Zaninovic, V. (eds.). Colombia, Cali, Feriva Editores, 1996. p.1-13.

THÉ, G. & BOMFORD, R. An HTLV-I Vaccine: Why, How, for Whom? **AIDS Research and Human Retroviruses** **9** (5): 381-6, 1993.

TSAO, K. C., CHEN, G. W., HUANG, C. G., HUANG, Y. L., LIN, J.Y., MOK, C. K., SUN, C.F., SHIH, S. R. False positive antibody results against human T-cell lymphotropic virus in patients with severe acute respiratory syndrome. **Journal of Medical Virology** **78** (1): 139, 2005.

TSUKASAKI, K. & TOBINAI, K. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. **Best Practice & Research Clinical Haematology** **26** (1): 3-14, 2013.

TUKE, P. W., LUTON, P., GARSON, J. A. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of nested PCR products. **Journal of Virological Methods** **40**: 163-73, 1992.

- URETA-VIDAL, A., ANGELIN-DUCLOS, C., TORTEVOYE, P., MURPHY, E., LEPÉRE, J., BUIGUES, R., JOLLY, N., JOUBERT, M., CARLES, G., POULIQUEN, J., THÉ, G., MOREAU, J. GESSAIN, A. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **International Journal of Cancer** **82** (6): 832-836, 1999.
- VALLINOTO, A.C., ISHAK, M. O., AZEVEDO, V. N., VICENTE, A. C., OTSUKI, K., HALL, W. W., ISHAK, R. Molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus type II infection in Amerindian and urban populations of the Amazon region of Brazil. **Human Biology** **74**: 633 - 644, 2002.
- VALLINOTO, A.C., MUTO, N. A., PONTES, G.S., MACHADO, L.F., AZEVEDO, V.N., DOS SANTOS, S.E., RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K., ISHAK, M.O., ISHAK, R. Serological and Molecular Evidence of HTLV-I Infection among Japanese Immigrants Living in the Amazon Region of Brazil. **Japanese Journal of Infectious Diseases** **57**: 156 – 159, 2004.
- VALLINOTO, A.C., PONTES, G.S., MUTO, N.A., LOPES, I.G., MACHADO, L.F., AZEVEDO, V.N., CARVALHAES, F.A., SANTOS, S.E., GUERREIRO, J.F., ISHAK, M.O., ISHAK, R. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajo Island (Para, Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **101** (1): 103-105, 2006.
- VALLINOTO, A. C., CARVALHO, F. T. C., SANTOS, A. B., SILVA, R. S. U., RIBEIRO, E. S., CORDEIRO, K. M., NEIVA, G. I., VIANA, G. M. R., ISHAK, M. O. G., PÓVOA, M. M., ISHAK, R. Occurrence of cross-reactivity to HTLV-1/2 antigens in patients with malaria from an endemic area of the brazilian amazon region. **Journal of Clinical Immunology** **32**: 2012.
- VERDONCK, K., GONZÁLEZ, E., DOOREN, S. V., VANDAMME, A., VANHAM, G., GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet Infectious Diseases** **7** (4): 266-81, 2007.

- VIANA, G. M. C., NASCIMENTO, M. D. S. B., OLIVEIRA, R. A. S., SANTOS, A. C., GALVÃO, C. S., SILVA, M. A. C. N. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** **36** (1): 50-53, 2014.
- WATANABE, T. Current status of HTLV-1 infection. **International Journal of Hematology** **94** (5): 430-4, 2011.
- WATANABE, T., SEIKI, M., YOSHIDA, M. HTLV Type I (U. S. Isolate) and ATL (Japanese isolate) Are the Same Species of Human Retrovirus. **Virology** **133** (1): 238-241, 1984.
- WATERS, A., OLIVEIRA, A. L. A., COUGHLAN, S., VENECIA, C., DORIS SCHORC, ANA-CLAUDIA LEITE D, ABELARDO Q.C. ARAÚJO, D, WILLIAM W. HALLA. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: Addressing the issue of indeterminate HTLV results. **Journal of Clinical Virology** **52**, 38-44, 2011.
- WOLFE, N. D., HENEINE, W., CARR, J. K., GARCIA, A. D., SHANMUGAM, V., TAMOUFE, U., TORIMIRO, J. N., PROSSER, A. T., LEBRETON, M., MPOUDINGOLE, E., MCCUTCHAN, F. E., BIRX, D. L. FOLK, T. M., BURKE, D. S., SWITZER, W. M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **102** (22): 7994-9, 2005.
- YAKOVA, M., LÉZIN, A. DANTIN, F., LAGATHU, G., OLINDO, S., JEAN-BAPTISTE, G., ARFI, S., CÉSAIRE, R. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. **Retrovirology** **2**: 2005.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **79** (6): 2031-5, 1982.
- YOUNIS, I., & GREEN, P. L. The human T-cell leukemia virus rex protein. **Frontiers in Bioscience** **10**: 431-445, 2005.

ZHANG, L., WEI, J., WANG, L., HUANG, S., CHEN, J. Human T-cell lymphotropic virus type 1 and its oncogenesis. **Acta Pharmacologica Sinica** **38** (8): 1093-1103, 2017.

APÊNDICE A - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

(PROJETO DE PESQUISA/EXTENSÃO – HTLV)

LABMOL: _____ DATA DA COLETA: ____/____/_____
 MATERIAIS COLETADOS: _____

INFORMAÇÕES CADASTRAIS

NOME: _____ IDADE: ____ SEXO: ____

ESTADO CIVIL: () Solteiro(a) () Casado(a)/Vive junto
 () Separado(a)/divorciado(a) () Viúvo(a)

ETNIA: () Branco () Negro () Indígena () Asiático () Pardo

PROFISSÃO/ OCUPAÇÃO: _____

ENDEREÇO: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ ESTADO: _____ TELEFONES: _____

Resid. Anterior 1: _____ Resid. Anterior 2: _____

DATA DE NASC.: ____/____/____

INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS (Sim e Não)

TRANSFUSÃO DE SANGUE: () Sim () Não Quando (ano): _____

MÃE VIVA: () Sim () Não

Nº IRMÃOS: _____ Nº FILHOS: _____

FOI AMAMENTADO NO PEITO: () Sim () Não Tempo: _____

RELAÇÃO SEXUAL:

() HOMOSSEXUAL () HETEROSSEXUAL () RELAÇÃO ESTÁVEL: TEMPO _____

TEVE MAIS DE UM PARCEIRO NA VIDA: () Sim () Não

Nº PARCEIROS NA VIDA: _____ Nº PARCEIROS NO ÚLTIMO ANO: _____

AMAMENTOU OS FILHOS: () Sim () Não Tempo: _____

INFORMAÇÕES SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICAS

RENDA FAMILIAR: () <1 MÍNIMO () 1 A 1,9 MÍNIMOS () DE 2 A 4,9 MÍNIMOS ()
 DE 5 A 10 MÍNIMOS () > 10 MÍNIMOS

ESCOLARIDADE: () NÃO ALFABETIZADO () ENSINO FUNDAMENTAL () ENSINO MÉDIO
 () ENSINO SUPERIOR

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Título: Pesquisando Infecções e doenças infecciosas na Extensão Universitária

O Vírus Linfotrópico-T Humano 1 e 2 (HTLV 1 e 2) pode provocar doenças no sistema nervoso que podem levar a paralisia nas pernas, impotência, perdas no controle urinário, entre outros sintomas, além de estar associado a casos de Leucemia/Linfoma (tipo raro de câncer). A transmissão familiar se dá através do contato sexual (homem e mulher) ou aleitamento materno (da mãe para o filho). Esta pesquisa tem como objetivo investigar as infecções e doenças infecciosas durante a extensão universitária minimizando os riscos das doenças associadas ao HTLV.

Caso você aceite participar, será coletado um pouco de sangue por profissionais treinados para este tipo de trabalho, para que não ocorra nenhum problema durante a coleta.

Posteriormente, nessa amostra de sangue, será investigada a presença do vírus, que será realizada em laboratório especializado da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do sujeito da pesquisa.

Os casos positivos para a infecção serão orientados e convidados para o acompanhamento clínico-ambulatorial e laboratorial no Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, onde serão esclarecidos sobre as formas de se evitar a transmissão do HTLV e sobre as principais doenças relacionadas.

Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo, assegurando o anonimato dos participantes, para evitar qualquer dano moral, uma vez que serão utilizados apenas pelos pesquisadores.

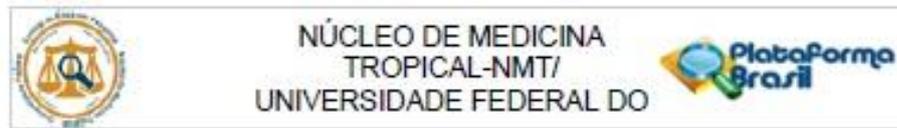
Fica claro que o sujeito da pesquisa ou o seu responsável legal, pode a qualquer momento, retirar seu consentimento, que esta pesquisa não apresenta nenhum tipo de ônus para o sujeito da pesquisa e que sua desistência em nada comprometerá o atendimento deste sujeito aos serviços oferecidos pela equipe do projeto.

Consentimento:

Declaro que li e compreendi as informações sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como os seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, _____/_____/201__ _____
Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

ANEXO A – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PESQUISANDO INFECÇÕES E DOENÇAS INFECCIOSAS NA EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA

Pesquisador: MAISA SILVA DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 38202214.6.0000.5172

Instituição Proponente: Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.218.417

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal analítico que vai investigar infecções e prevenir doenças sexualmente transmissíveis, a partir de demanda proveniente de ações de extensão universitária, visando não só conhecer os indicadores relacionados, mas também direcionar para o tratamento, quando necessário, e orientar sobre as vias de transmissão, doenças associadas e modos de prevenção de novas infecções.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar a prevalência de infecções e doenças causadas por transmissão sexual em mulheres atendidas durante as ações de extensão universitária.

Objetivo Secundário:

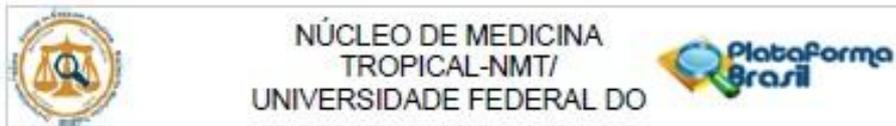
- Descrever o perfil epidemiológico das mulheres atendidas;
- Estimar a diversidade e as frequências de IST;
- Determinar a diversidade e as frequências de lesões no colo do útero.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Foi informado que os riscos para as participantes do estudo serão minimizados no momento da

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
 Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
 UF: PA Município: BELEM
 Telefone: (91)3201-0981 E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Parecer: 1.216.417

coleta da amostra e das informações, reduzindo qualquer constrangimento ou incômodo tanto de ordem física quanto de ordem moral, para que não haja experiências traumáticas para com as mesmas. A coleta das amostras será realizada por equipe treinada. Os dados obtidos das participantes serão totalmente confidenciais e sua identidade será mantida no mais absoluto sigilo no ato da divulgação desta pesquisa.

Benefícios:

Como benefício direto a participante, esta receberá orientações quanto a prevenção de doenças provenientes de infecções sexualmente transmissíveis, além de, se identificada com alguma infecção ou alteração no exame de PCCU, poderá ser atendida por ginecologista no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical. Esta pesquisa demanda grande importância para a saúde pública, pois objetiva obter indicadores de infecções e lesões no colo do útero de mulheres que geralmente são carentes de condições e informações quanto a prevenção de doenças causadas por infecções sexualmente transmissíveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo será desenvolvido no período de setembro de 2015 a agosto de 2016 e que tem como público alvo, pessoas que participarem das ações de extensão da Universidade Federal do Para, voltadas para a detecção e prevenção de infecções e doenças infecciosas. A coleta de amostras biológicas (sangue, urina, secreção cervico-vaginal), necessárias para a realização dos exames, será realizada nos Laboratórios de Biologia Molecular e Celular e o de Análises Clínicas, ambos do Núcleo de Medicina Tropical, além do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

Tamanho da Amostra no Brasil: 400

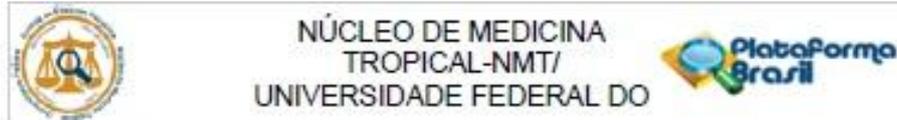
Critério de Inclusão:

Serão incluídas pessoas que participarem das ações de extensão da Universidade Federal do Para e que aceitarem participar voluntariamente da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No caso de menor de 18 anos, será solicitada a autorização dos responsáveis, caso a pessoa não seja emancipada.

Critério de Exclusão:

Serão excluídas do estudo as pessoas que realizarem o exame, mas não aceitarem participar da

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 82
 Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
 UF: PA Município: BELEM
 Telefone: (01)3201-0961 E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Parecer: 1.218.417

pesquisa; aquelas cujas amostras não forem viáveis para análise molecular e aquelas que não apresentarem qualquer uma das informações necessárias para se alcançar os objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados adequadamente.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Na relatoria passada foram solicitadas as seguintes informações:

- Indicar claramente em materiais e métodos onde serão recrutadas as mulheres participantes do projeto;
- Indicar claramente em materiais e métodos onde serão feitas as coletas de material biológico: células do cerviço uterino e sangue;
- Dependendo de onde serão recrutadas e onde serão coletadas as amostras biológicas, anexar carta de anuência da instituição.

Os pontos apresentados acima foram respondidos adequadamente, possibilitando a aprovação do protocolo de pesquisa para execução.

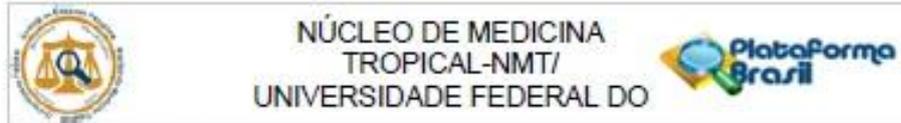
Observar que a fase de coleta de dados fica liberada a partir da liberação deste parecer, uma vez que a data definida no cronograma era o de 01/09/2015. Favor enviar via plataforma Brasil o relatório final do projeto, uma vez tenha sido finalizado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto CEP Extensão Universitária e Infecções.docx	29/10/2014 14:18:43		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto projeto IST.pdf	03/11/2014 17:42:53		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_360242.pdf	03/11/2014 17:43:40		Aceito

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 62
 Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
 UF: PA Município: BELEM
 Telefone: (91)3201-0951 E-mail: cepbel@ufpa.br



Continuação do Parecer: 1.210-417

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE PCCU_IST_UFPA_modificado.docx	11/03/2015 08:49:02		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_380242.pdf	11/03/2015 08:51:42		Aceito
Outros	Declaração Ricardo LAC.jpg	29/05/2015 19:22:35		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_380242.pdf	29/05/2015 19:30:18		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 08 de Setembro de 2015

Assinado por:
ANDERSON RAIOL RODRIGUES
(Coordenador)

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 62
Bairro: Umarizal CEP: 66.055-240
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-0981 E-mail: cepbel@ufpa.br