

MARIA GISELE GONÇALVES

**Padronização e validação da PCR em tempo real para
a detecção rápida e quantificação de carga proviral
de HTLV-1 e HTLV-2.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

SÃO PAULO

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Gonçalves, Maria Gisele

Padronização e validação da PCR em tempo real para a detecção rápida e quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2/Maria Gisele Gonçalves. -2019.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Adele Caterino de Araújo.

1. HTLV-1.
2. HTLV-2.
3. Diagnóstico laboratorial.
4. PCR em tempo real.
5. Estudos de validação.

SES/CCD/CD-393/2019

Elaborado por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Dedicatória

***A minha mãe Maria Benedita Macedo
E aos 8 filhos de Maria...***

*Meus exemplos de luta, perseverança e
decência.*

*A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o
bastante para aprender.*

Clarice Lispector

Agradecimentos

À **Dra. Adele Caterino de Araujo**, pelos ensinamentos, orientação, paciência, incentivo, dedicação, carinho e cuidado,... , me faltam palavras de gratidão. Muito obrigada pela confiança, pelo exemplo de ser humano e profissional. Você é realmente um ser especial, que dia-a-dia tira leite de pedra, sempre com muita paixão pelo trabalho e sem se abater pelas dificuldades; transformar espinhos em flor é para poucos!

À **Karoline Rodrigues Campos**, pela coorientação, acolhimento e disponibilidade em colaborar e transmitir seus conhecimentos, sempre com muito profissionalismo e serenidade.

À **Nadia Costa**, pela cooperação e assistência no decorrer do caminho.

À **Lucila Okuyama Fukasawa** pela parceria, colaboração e companheirismo neste estudo e pelo desenvolvimento dos genes sintéticos.

À **Camila Cardoso de Oliveira** e **Ana Carolina Apelle Bortolucci** pela assessoria estatística, profissionalismo e paciência.

Ao **Fábio Takenori Higa** e à **Maristela Marques Salgado** pela colaboração técnica, apoio profissional e pessoal, pelas réplicas e tréplicas e compreensão.

A toda equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular de Infecções Bacterianas, acima e: **Alonso Fernandes**, **Terezinha Pereira de Araújo** e **Vanessa Cristina Barbosa**, pela colaboração nas etapas iniciais de manipulação das amostras (cadastro, triagem e separação das amostras de rotina). Enfim, a todos do **grupo**, que se sobrecarregaram diariamente para permitir a minha ausência durante as realizações dos cursos - **MUITO OBRIGADA!**

Ao Dr. **Cláudio Tavares Sacchi** pelos ensinamentos e sabedoria transmitidos no trilhar do caminho e pela compilação de dados dos prontuários dos pacientes.

À **Ana Késia de Lima** pela realização de parte dos ensaios de triagem e confirmação sorológica das amostras da rotina diagnóstica.

A todos os funcionários do Centro de Imunologia que direta ou indiretamente suavizaram minha jornada.

Aos membros da Banca de Exame de Qualificação, Profa. **Dra. Regina Celia Moreira**, Dra. **Adriana Luchs** e Profa. Dra. **Mariana Cavalheiro Magri**, pelos apontamentos e sugestões.

Àos meus companheiros de vida, **Rafael Luiz da Silva** (marido) e **Henry Gonçalves Silva** (filho): por me ajudarem a transpor as dificuldades e festejarem comigo as alegrias.

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

Apoio Financeiro:

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

FAPESP # 2012/51220-8

FAPESP # 2016/03654-0

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Gonçalves MG. Padronização e validação da PCR em tempo real para a detecção rápida e quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2.

RESUMO

O diagnóstico laboratorial de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) se baseia na triagem sorológica para pesquisa de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (EIA), seguido pelo teste confirmatório de *Western Blot* (WB) ou imunoensaio de linha (LIA). No entanto, WB (mais utilizado no Brasil) apresenta altos percentuais de resultados indeterminados, principalmente nas coinfeções HIV/HTLV-1/-2, além de ter alto custo. Uma alternativa ao diagnóstico confirmatório sorológico são as técnicas moleculares. O objetivo do presente estudo foi de padronizar e validar dois ensaios de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção simultânea (formato *multiplex*) de HTLV-1, HTLV-2 e gene de referência (XqPCR HTLV) observando todos os parâmetros estabelecidos no Manual de Validação de Ensaio do Instituto Adolfo Lutz. Foram pesquisados dois segmentos do genoma proviral destes vírus (*pol* e *tax*) e o gene da albumina humana como referência; usados plasmídeos para construção de curvas padrão e padronização dos testes, e avaliadas nove marcas de reagentes comerciais e duas plataformas de qPCR. Os resultados obtidos na padronização confirmaram a viabilidade de uso das duas XqPCR HTLV para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/-2, independentemente do reagente e plataforma utilizados. Quando aplicadas para validação em 39 amostras de indivíduos sem a infecção pelo HIV, a sensibilidade das XqPCR foi de 97%. Em amostras de pacientes com a coinfeção por HIV, a sensibilidade foi de 66,4% (101/152) para XqPCR HTLV_*pol* e 62,5% (95/152) para a XqPCR_*tax*, e especificidade de 100%. Foram ainda capazes de identificar 45,5% dos 22 casos WB-indeterminados e 66,7% dos nove HTLV não tipados. As XqPCR também mostraram aplicabilidade na quantificação de carga proviral com limites de detecção entre 2 e 3 cópias para HTLV-1 e 19 e 31 cópias para HTLV-2, para os alvos *pol* e *tax*, respectivamente. Concluindo, as XqPCR HTLV se mostraram

sensíveis e específicas, úteis para o diagnóstico e monitoramento de infecção por HTLV-1/-2, podendo ser utilizadas em diferentes plataformas e com diferentes marcas de reagentes.

Palavras-chave: HTLV-1, HTLV-2, diagnóstico laboratorial, PCR em tempo real, estudos de validação.

Gonçalves MG. Standardization and validation of real-time PCR assay for rapid detection and proviral load quantification of HTLV-1 and HTLV-2.

ABSTRACT

The laboratorial diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) is based on the search of specific antibodies in sera using enzyme immunoassay (EIA) as screening, and Western blot (WB) or line immunoassay (LIA) as confirmatory assays. However, the WB (which is the mostly employed in Brazil) shows high percentages of undetermined profiles, especially in HIV/HTLV-1/-2 coinfecting individuals; indeed, it is too expensive. Thus, the molecular tests are an alternative to serological confirmatory assays. The present study aimed at standardizing and validating two real-time PCR (qPCR) assays in a multiplex format for detecting simultaneously HTLV-1, HTLV-2, and an endogenous control, considering the Protocol for Assays Validation established by the Instituto Adolfo Lutz. Two segments of the proviral genome of HTLV-1 and HTLV-2 were selected for the *pol* and *tax* analysis and one segment of the human albumin gene (XqPCR HTLV). Plasmids were used for the standard curves constructions and for assays standardization, and nine different commercial reagents and two qPCR platforms were tested. The obtained results confirmed the viability of the use of the two XqPCR (*pol* and *tax*) in HTLV-1/-2 routine diagnosis. When applied for validating 39 samples from patients without HIV infection, the XqPCR HTLV showed sensitivity of 97%. In samples from HIV-infected patients, the XqPCR HTLV_*pol* showed sensitivity of 66.4% (101/152), and the XqPCR HTLV_*tax* of 62.5% (95/152), and specificity of 100%. Indeed, they confirmed 45.5% of 22 WB-indeterminate and 66.7% of 9 untypeable samples. When used in the proviral load quantification, the XqPCR showed detection limit of 2 and 3 copies for HTLV-1, and 19 and 31 copies for HTLV-2, in *pol* and *tax* target genes, respectively. In conclusion, the XqPCR HTLV (*pol* and *tax*) proved to be sensitive and specific, and useful for the diagnosis and follow up of HTLV-1 and HTLV-2 infected patients, with the advantage to

be employed in different platforms and with different brands of XqPCR reagents.

Key words: HTLV-1, HTLV-2, laboratorial diagnosis, real-time PCR, validation studies.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Alb	Albumina
am	Amostra biológica
ATLL	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> - Leucemia linfoma de células T do adulto
BHQ1	<i>Black Hole Quencher</i> (molécula bloqueadora de luz)
°C	Graus Celsius
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLIA	<i>chemiluminescent assay</i> – ensaio de quimiluminescência
CITV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
CMN	Células Mononucleares
CPV	Carga Proviral
Cp	<i>Crossing point</i>
Cq	Ciclo de quantificação do sinal fluorescente
CRT/aids	Centro de Referência e Treinamento/aids
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CV	Carga viral
Cy5	Fluoróforo de cianina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
DNase	Enzima catalisadora de ácido desoxirribonucléico
dqPCR	<i>Digital quantitative PCR</i> – PCR em tempo real digital
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	<i>Enzyme Immune Assay</i> - Ensaio imunoenzimático <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> - ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISA	
et al.	Em conjunto com
FAM	Fluoróforo 6-carboxi (Hexacarboxy fluorescein)
GR	Gene de referência

HAM/TSP	<i>HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis</i> - Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> - vírus da hepatite B
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> - vírus da hepatite C
HEX	Fluoróforo 6-cloro (<i>Hexachloro-Fluorescein</i>)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> - vírus da imunodeficiência humana
HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas
HTLV-1	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 1</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1
HTLV-2	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 2</i> - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	Intervalo de Confiança
IND	Indeterminado
INNO-LIA	<i>Line immunoassay from Innogenetics</i> - Imunoensaio de linha da marca Innogenetics
Kit	Conjunto de reagentes
Kb	Kilobase
LIA	<i>Line immunoassay</i> - imunoensaio de linha
LMD	Limite mínimo de detecção
LMQ	Limite mínimo de quantificação
LTR	<i>Long terminal repeat</i> - Sequências terminais de longa repetição
MS	Ministério da Saúde do Brasil
<i>n</i>-PCR	<i>Nested-Polymerase Chain Reaction</i> – segunda etapa de reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores internos ao produto da primeira reação
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

min	Minuto
mL	Mililitros (10^{-3} Litros)
μL	Microlitros (10^{-6} Litros)
nM	NanoMolar (10^{-9} Molar)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i> - razão de chances/possibilidades
ORF	<i>Open reading frame</i> - Regiões abertas para leitura
PA	<i>Particle Agglutination</i> – Aglutinação em partícula
pb	Pares de bases
Pb	<i>Probe</i> - sonda
PBL	<i>Peripheral blood leukocytes</i> - Leucócitos do sangue periférico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase <i>PCR - Restriction Fragments Length Polymorphism</i> -
PCR-RFLP	Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição enzimática em produtos de PCR
qPCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase em tempo real ou quantitativa
qsp	Quantidade suficiente para
ROX	Fluoróforo de referência passiva (5-carboxy-X-Rhodamine)
RT	<i>Reverse transcriptase</i> – Transcriptase reversa (TR)
TARV	Terapia antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
UDI	Usuário de drogas injetáveis
XqPCR	PCR em tempo real com múltiplos alvos
WB	<i>Western blot</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da organização genômica do HTLV-1 e das respectivas proteínas traduzidas em cada região.	22
Figura 2. Representação das partículas virais de HTLV-1 e HIV-1.	23
Figura 3. Principais etapas da infecção pelo HTLV-1 e manifestações clínicas associadas.	26
Figura 4. Curvas de amplificação da qPCR HTLV_ <i>tax</i> usando plasmídeos HTLV-1/Alb e HTLV-2/Alb e diluição 1/mil e 1/1 milhão	48
Figura 5. Curva de amplificação dos plasmídeos <i>tax1</i> e <i>tax2</i> .	57
Figura 6. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i> para a detecção do HTLV-1 (<i>pol</i>).	63
Figura 7. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i> para a detecção do HTLV-2 (<i>pol</i>).	64
Figura 8. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i> para a detecção do HTLV-1 (<i>tax</i>).	64
Figura 9. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i> para a detecção do HTLV-2 (<i>tax</i>).	65
Figura 10. Curva Padrão LMD HTLV-1_ <i>pol</i> (ABI e ROCHE).	66
Figura 11. Curva padrão LMD HTLV-2_ <i>pol</i> (ABI e ROCHE).	67
Figura 12. Curva padrão LMD HTLV-1_ <i>tax</i> (ABI e ROCHE).	67
Figura 13. Curva padrão LMD HTLV-2_ <i>tax</i> (ABI e ROCHE).	68
Figura 14. Curvas de amplificação obtidas nas reações de qPCR nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i> - <i>master mix</i> TaqMan Universal PCR Master Mix- ABI.	72
Figura 15. Avaliação de nove marcas de <i>master mix</i> comerciais na XqPCR HTLV_ <i>pol1</i> .	73
Figura 16. Avaliação de nove marcas de <i>master mix</i> comerciais na	74

XqPCR HTLV_*pol2*.

Figura 17. Avaliação de sete marcas de *master mix* comerciais na **75**

XqPCR HTLV_*tax1*.

Figura 18. Avaliação de sete marcas de *master mix* comerciais na **76**

XqPCR HTLV_*tax2*.

Figura 19. Curvas de amplificação para análise de variação na **78**
intensidade de fluorescência, com e sem MgCl₂.

Figura 20. Plotagem da curva de amplificação - quantificação HTLV-1. **89**

Figura 21. Plotagem da curva de amplificação - quantificação HTLV-2. **89**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Publicações sobre o emprego de técnicas moleculares para o diagnóstico confirmatório e discriminatório, caracterização molecular e determinação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2.	140
Quadro 2. Esquema das concentrações empregadas na padronização dos oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) utilizados na padronização das XqPCR HTLV.	46
Quadro 3. Sequência e marcação dos oligonucleotídeos empregados na XqPCRHTLV_ <i>pol</i> .	60
Quadro 4. Protocolo de reação da XqPCR HTLV_ <i>pol</i> (volumes e concentrações) empregados para o calculo nas plataformas ABI e Roche.	61
Quadro 5. Sequência e marcação dos oligonucleotídeos empregados na XqPCR HTLV_ <i>tax</i> .	61
Quadro 6. Protocolo de reação da XqPCR HTLV_ <i>tax</i> (volumes e concentrações) empregados para o calculo nas plataformas ABI e Roche.	62
Tabela 1. Avaliação da estabilidade das concentrações dos genes sintéticos <i>pol</i> e <i>tax</i> empregados na detecção e identificação de HTLV-1 e HTLV-2, após cinco ciclos de congelamento e descongelamento.	69
Tabela 2. Avaliação da reprodutibilidade/robustez do ensaio XqPCR HTLV empregando-se o gene <i>pol</i> e <i>tax</i> para a detecção e identificação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2.	70
Quadro 7. Valores de Cq (<i>Cycle quantification</i>) obtidos pelos controles positivos nas reações de XqPCR HTLV empregando-se diferentes marcas de <i>master mix</i> sem e com adição complementar de magnésio na plataforma da Roche LightCycler 480II.	77
Quadro 8. Valores de Cq (<i>Cycle quantification</i>) (em duplicata) obtidos nas reações de XqPCR HTLV empregando-se diferentes marcas de <i>master mix</i> sem e com adição complementar de magnésio na plataforma ABI 7.500.	77
Quadro 9. Análise comparativa entre os resultados do ensaio de	79

qPCR HTLV empregando o gene alvo *pol*, nos formatos *single* e *multiplex* para a detecção e identificação de HTLV-1, HTLV-2 e gene de referência em amostras da rotina diagnóstica.

Quadro 10. Resultados das XqPCRHTLV (*pol* e *tax*) em relação ao teste confirmatório de referência Western Blot, em amostras do Grupo 1, suspeitas de infecção por HTLV e soronegativas para o HIV. 81

Quadro 11. Análise geral e comparativa de desempenho entre os testes XqPCR HTLV (*pol* e *tax*), Western Blot e LIA aplicados em amostras suspeitas de infecção por HTLV e soropositivas para o HIV (Grupo 2). 82

Quadro 12. Resultados da pesquisa de HTLV em amostras do Grupo 2, provenientes de pacientes soropositivos para HIV, do CRT/aids e rotina diagnóstica do IAL, submetidas aos ensaios de WB, XqPCR HTLV_*pol* e *tax* (n=152) e LIA (n=89). 83

Tabela 3. Análises de precisão e reprodução (inter-ensaio) de 10 amostras biológicas, com concentrações de DNA estimadas em alta, média, baixa e escassa, em duplicatas, submetidas a 4 desafios/repetições/dias, na XqPCR HTLV (*pol* e *tax*), simultaneamente. 86

Tabela 4. Resultados de reprodução e precisão em duas amostras com 6 réplicas no mesmo ensaio. 87

Quadro 13. Resultados de quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 em amostras de pacientes previamente positivos empregando-se a XqPCR HTLV_*pol*. 88

Quadro 14. Análise de custos de algoritmos de testes confirmatórios sorológicos (WB ou INNOLIA) e moleculares [XqPCR HTLV (*pol* ou *tax*)] para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2, em população sem a infecção pelo HIV. 91

Quadro 15. Análise de custos de algoritmos de testes confirmatórios sorológicos (WB ou INNOLIA) e moleculares [XqPCR HTLV (*pol* ou *tax*)] para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2, em população infectada pelo HIV. 92

ÍNDICE

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Histórico, classificação e morfologia	21
1.2. Vias de Transmissão e propagação viral	23
1.3. Epidemiologia e doenças relacionadas	27
1.4. Coinfecções	30
1.5. Diagnóstico Laboratorial	32
2. OBJETIVOS	38
2.1. Geral	38
2.2. Específicos	38
3. MATERIAL	39
3.1. Amostras de estudo	39
3.1.1. Critério de inclusão e exclusão	39
3.1.2. Grupos de estudo	39
3.1.3. Aspectos Éticos	40
3.1.4. Extração de DNA humano e DNA proviral	41
3.2. Padronização dos ensaios	42
3.2.1. Plasmídeos pHTLV1-Alb e pHTLV2-Alb	42
3.2.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	43
3.2.3. Otimização do ensaio de XqPCR HTLV_ <i>pol</i>	44
3.2.4. Padronização do ensaio de XqPCR HTLV_ <i>tax</i>	44
3.2.5. Especificidade dos oligonucleotídeos	45

3.2.6. Concentração dos oligonucleotídeos: Iniciadores (<i>Primers</i>), Sondas (<i>Probes</i>) e Ciclagens	46
3.2.7. Determinação da concentração de plasmídeos para serem usados como controles positivos de reação	47
3.2.8. Cálculo do número de cópias dos plasmídeos	48
3.2.9. Estabilidade da curva padrão	49
3.3. Avaliação dos ensaios de XqPCR – Indicadores de desempenho	49
3.3.1 Linearidade: Comparação entre os formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i> para os alvos <i>pol</i> e <i>tax</i> pela curva padrão	49
3.3.2. Avaliação da eficiência/sensibilidade do ensaio	50
3.3.3. Especificidade analítica e diagnóstica do ensaio	51
3.3.4. Ensaios de reprodutibilidade entre diferentes analistas – Precisão intermediária	51
3.3.5. Análise/expressão dos resultados da XqPCR HTLV	51
3.3.6. Marcas de reagentes de <i>Master Mix</i>	52
3.3.7. Otimização: inclusão de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) na XqPCR HTLV	54
3.4. Aplicação diagnóstica	55
3.4.1. Análise comparativa das qPCR HTLV nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i>	55
3.4.2. Sensibilidade diagnóstica X-qPCR HTLV (<i>pol</i> e <i>tax</i>) X WB	55
3.4.3. Precisão	56
3.5. Ensaio de quantificação da carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2	56
3.6. Análise estatística	58
3.7. Análise de custos	59
3.8. Conflito de Interesse	59
4. RESULTADOS	60
4.1. Otimização e padronização de protocolo das reações XqPCR	60

HTLV	
4.1.1. Determinação da concentração de plasmídeos para serem usados como controles positivos de reação	62
4.2. Linearidade	63
4.3. Sensibilidade Analítica - Limite Mínimo de Detecção (LMD)/ Eficiência	65
4.3.1. Curva padrão/LMD para o HTLV-1, com o alvo gene <i>pol</i>	65
4.3.2. Curva padrão/LMD para o HTLV-2, com o gene <i>pol</i>	66
4.3.3. Curva padrão/LMD para o HTLV-1 com o gene <i>tax</i>	67
4.3.4. Curva padrão/LMD para HTLV-2 com o gene <i>tax</i>	68
4.4. Estabilidade da curva padrão	68
4.5. Especificidade	69
4.6. Reprodutibilidade	70
4.7. Avaliação de reagentes comerciais (<i>Master mix</i>)	70
4.8. Otimização com Cloreto de Magnésio	77
4.9. Aplicação Diagnóstica	78
4.9.1. Análise comparativa das qPCR HTLV nos formatos <i>single</i> e <i>multiplex</i>	78
4.9.2. Sensibilidade diagnóstica XqPCR HTLV (<i>pol</i> e <i>tax</i>) X WB	80
4.9.2.1. Casuística do Grupo 1 (HIV- / UPE e Rotina-IAL)	80
4.9.2.2. Casuística do Grupo 2 (HIV+ / CRT/aids e Rotina-IAL)	81
4.9.3. Especificidade diagnóstica	85
4.9.4. Precisão	85
4.9.5. Ensaio de quantificação da carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 – aplicação diagnóstica	87
4.9.6. Cálculos de Probit	90
4.9.7. Análise de Custos	90
5. DISCUSSÃO	93

5.1. Padronização/otimização e indicadores de desempenho dos testes propostos	93
5.2. Aplicação diagnóstica	101
6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	112
7. CONCLUSÃO	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
9. ANEXOS	140
9.1. Quadro 1. Publicações sobre o emprego de técnicas moleculares para o diagnóstico confirmatório e discriminatório, caracterização molecular e determinação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2.	
9.2. Aprovação do Comitê de Ética	

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico, classificação e morfologia

Os vírus linfotrópicos de células T humanas (*human T-cell lymphotropic virus* - HTLV) estão classificados na família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* e gênero *Deltaretrovirus* (CITV, 2009). Há quatro tipos virais, sendo o HTLV-1 o primeiro retrovírus humano descrito, isolado de células do sangue periférico de pacientes com linfoma cutâneo de células T (Poiesz et al., 1980). Em 1982, foi isolado de células do baço de um paciente com tricoleucemia de células T o HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982) e, desde então, não houve relato de outros casos de leucemia associados a este tipo viral. Em 1983, dois grupos de pesquisadores, um na França (Barre-Sinoussi et al., 1983) e outro nos Estados Unidos (Gallo et al., 1984), isolaram outro retrovírus humano que se tornou conhecido como o agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids, *acquired immunodeficiency syndrome*). Inicialmente, o vírus foi designado LAV (*lymphadenopathy-associated virus*) pelos franceses e HTLV-III pelos americanos. Em 1985, com a finalidade de uniformizar a terminologia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) oficializou o nome de vírus da imunodeficiência humana (HIV, *human immunodeficiency virus*). Os HTLV-3 e HTLV-4 foram descritos mais recentemente em indivíduos sadios de Camarões, na África Central (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005).

Os HTLV possuem envelope composto por proteínas virais e parte da membrana da célula hospedeira. Contêm no seu interior duas fitas simples de RNA com polaridade positiva, que atuam como molde para a transcrição reversa e formação do DNA complementar. Este DNA se insere na célula hospedeira na forma de provírus. Seu genoma contém regiões que codificam proteínas estruturais do cerne viral (*gag*), enzimas (*pol*), proteínas do envelope viral (*env*) e proteínas reguladoras (*pX*), flanqueadas nas posições 5' e 3' por longas sequências repetitivas de nucleotídeos (LTR,

long terminal repeat), que através de regiões de leitura aberta (ORF, *Open Reading Frame*) regulam a expressão de genes e a replicação viral (**Figura 1**). A região *gag* codifica as proteínas estruturais da matriz (MA, p19), capsídeo (CA, p24) e nucleocapsídeo (NC, p15), a região *pol* as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (RT, *reverse transcriptase* ou TR, transcriptase reversa) e integrase (IN), a região *env* as proteínas de superfície (SU, gp46) e transmembrana (TM, gp21), e a região *pX* as proteínas envolvidos na transformação e/ou supressão celular (Tax e Rex), além de outras proteínas menores e proteínas transcritas no sentido 3'- 5': HBZ no HTLV-1 e APH-2 no HTLV-2. (Carneiro-Proietti, 2015) (**Figuras 1 e 2**).

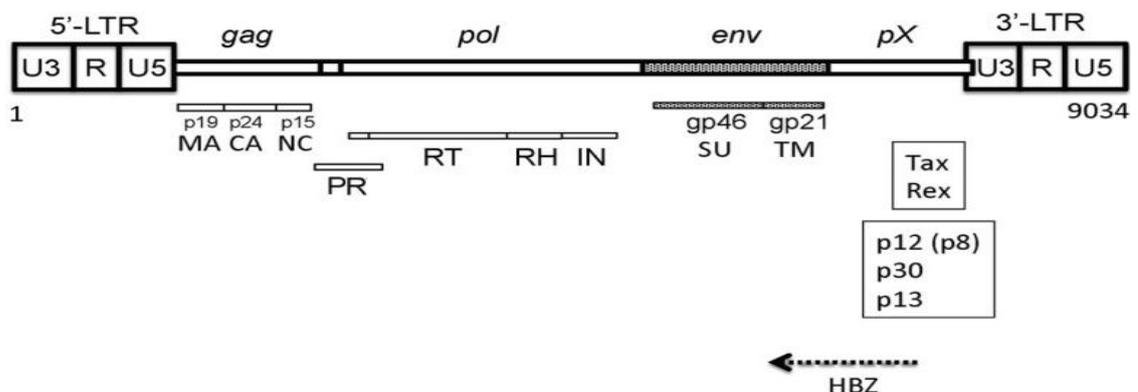


Figura 1. Representação esquemática da organização genômica do HTLV-1 e das respectivas proteínas traduzidas em cada região.

Fonte: https://www.researchgate.net/Structure-of-HTLV-1-genome-The-gag-gene-encodes-the-matrix-MA-capsid-CA-and_fig1_228071952. [Acessado em 17 de abril de 2018].

Há que se destacar que os retrovírus humanos possuem estruturas genômicas e morfologias semelhantes, como pode ser observado na **Figura 2**.

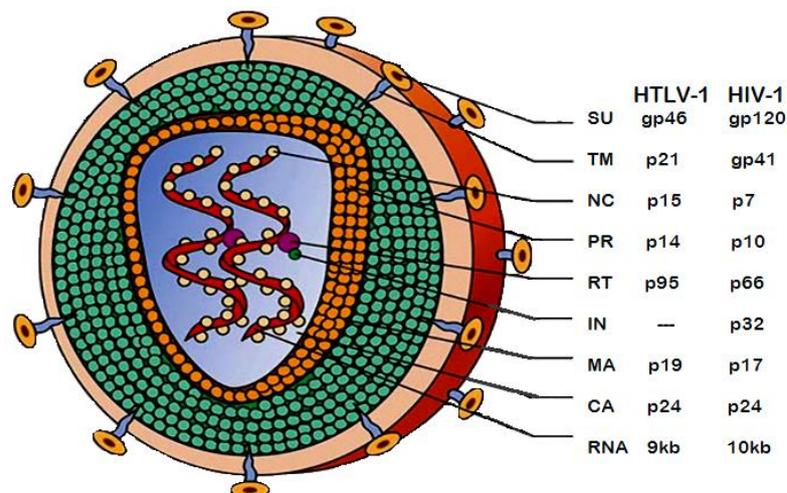


Figura 2. Representação das partículas virais de HTLV-1 e HIV-1.

Legenda: Proteínas estruturais, enzimas e material genético dos retrovírus humanos, mostrando a semelhança entre o HTLV-1 e o HIV-1.

Fonte: http://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0071402357/156712/figure172_3.html

1.2. Vias de transmissão e propagação viral

Os retrovírus humanos compartilham vias de transmissão, embora a infecção por HTLV necessite de contato com fluido biológico contendo células infectadas. Atualmente as vias mais importantes de transmissão dos HTLV são a sexual (pelo sexo desprotegido), a vertical (pela amamentação prolongada), e a parenteral (pelo uso de drogas injetáveis, UDI) (Paiva e Casseb, 2014).

Quanto à via sexual, há maior possibilidade de transmissão do homem para a mulher e após múltiplas exposições que acontecem com o decorrer dos anos. Já na transmissão vertical, a amamentação por mais de seis meses favorece a transmissão viral e medidas de prevenção incluem a orientação de não amamentar e o fornecimento de fórmula infantil (Paiva e Casseb, 2014). Em relação à via parenteral, a transmissão por transfusão de sangue infectado deixou de ser uma via importante de transmissão viral, pois a sorologia para os HTLV-1/2 tornou-se obrigatória em bancos de sangue no Brasil, em 1993 (MS, 1993).

Curiosamente, os HTLV-1 e HTLV-2 tem tropismo diferencial para linfócitos T; o HTLV-1 tem tropismo preferencial por linfócito T CD4+ enquanto o HTLV-2 por linfócito T CD8+ (Bangham et al., 2014; Melamed et al., 2014).

Durante a infecção por HTLV, o DNA viral é inserido no genoma da célula hospedeira, constituindo um provírus; quando o vírus eclode da célula hospedeira, necessita do contato célula a célula para a sua propagação, de tal modo que a transmissão por partículas livres no sangue é praticamente inexistente e/ou ineficiente, exceto para células dendríticas onde os HTLV se propagam pela formação de biofilme, predominante em monócitos (Verdock et al., 2007; Lairmore et al., 2012; Matsuoka e Yasunaga, 2013; Gross e Thoma-Kress, 2016; Tanaka e Matsuoka, 2018).

Embora reconhecida a transmissão por células dendríticas, Dutarte e colaboradores (2016), relataram que a infecção pode não ser produtiva, caso ocorra por partículas virais livres, devido sua baixa concentração e destruição pelo sistema imunológico. Neste caso, a transferência das partículas virais deverá ocorrer através de vesículas.

Como a carga proviral (CPV) de HTLV é baixa, a proliferação clonal das células infectadas é quem promove a disseminação do vírus no organismo. Nos linfócitos a quantidade de partículas provirais de HTLV-1 é da ordem de 1 cópia em 10^4 - 10^5 células, sendo 95% em células CD4+ e 5% em CD8+ (Gross e Thoma-Kress, 2016). Para o HTLV-2 têm sido descrita menor CPV em mulheres e menor proliferação clonal durante a história natural da infecção, quando comparado ao HTLV-1 (Montanheiro et al., 2008; Melamed et al., 2014). Além dos linfócitos T, os HTLV se perpetuam em diferentes linhagens de células hematopoiéticas (neutrófilos, monócitos e linfócitos B), possivelmente utilizando-as como reservatórios (Furuta et al., 2017). O tempo médio estimado entre a infecção por HTLV-1 e o desenvolvimento de doença é longo e geralmente ocorre por volta da quarta década de vida, podendo o indivíduo infectado permanecer apenas como portador (Taylor, 2001; Verdonck et al., 2007).

As principais etapas envolvidas na infecção pelo HTLV-1 e doenças a ele relacionadas foram ilustradas no artigo de Futsch et al., 2018 (**Figura 3**). Resumidamente os autores apontam que a disseminação das células infectadas ocorre pela proximidade com células dendríticas, capazes de transmitir o vírus para os linfócitos T CD4+ (**A**). A seguir, ocorre a disseminação entre os linfócitos T CD4+, através de contato célula-célula por microtúbulos celulares, sinapse ou formação de biofilme (**B**). A expressão da proteína Tax nas células infectadas resultará em alterações de sinalização celular, com a proliferação contínua (imortalização das células T CD4+) e inibição de apoptose. Células imortalizadas e infectadas pelo HTLV-1 irão proliferar através de divisões mitóticas, também conhecidas como expansão clonal (**C**). A partir daí, 1% a 2% dos indivíduos irão desenvolver a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP, *HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis*) e 2% a 4% a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL, *adult T cell leukemia/lymphoma*) (**Figura 3**).

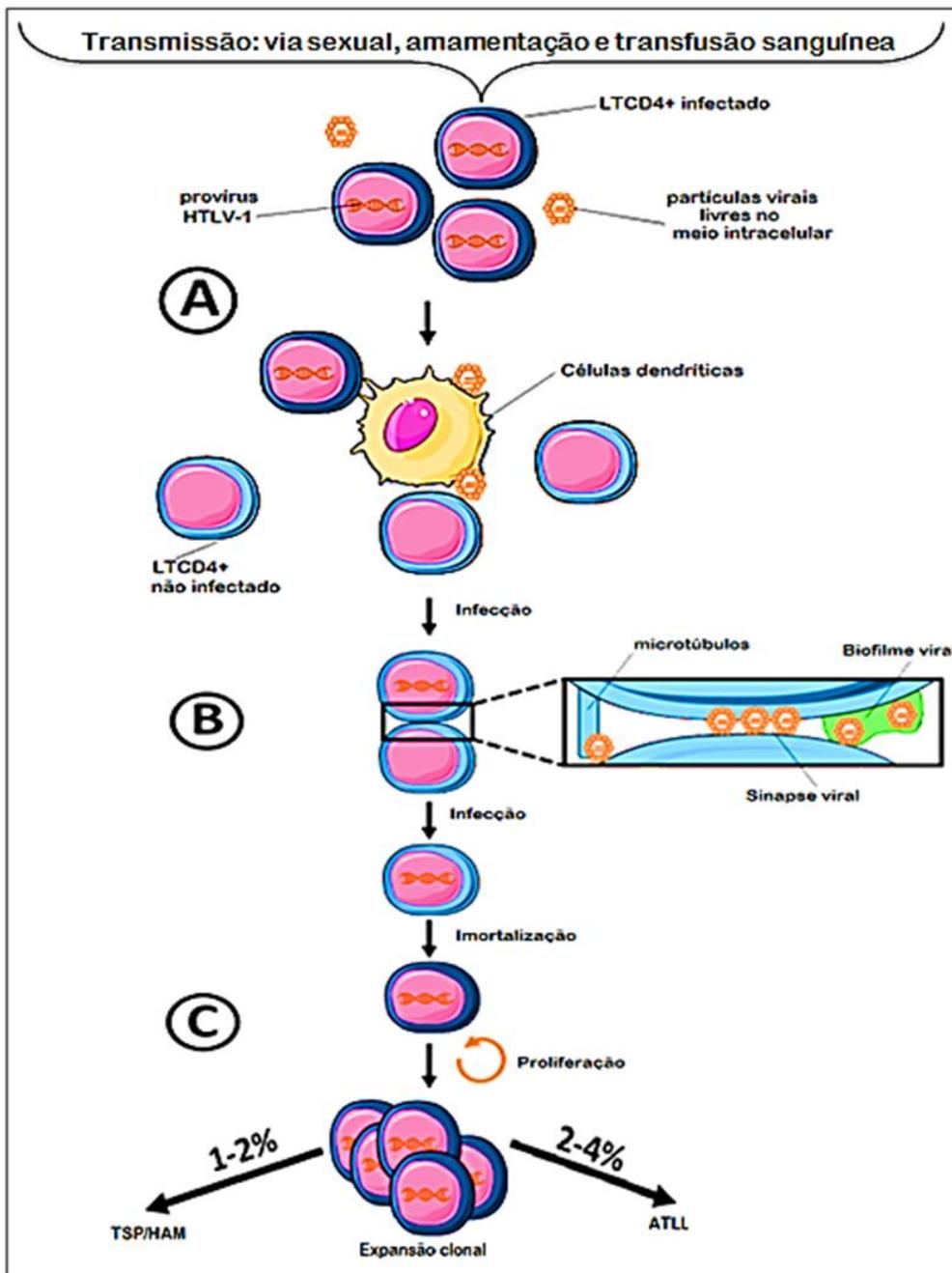


Figura 3. Principais etapas da infecção pelo HTLV-1 e manifestações clínicas associadas.

Fonte: Adaptado de Futsch et al. *Viruses* 2018, 10, 1; doi:10.3390/v10010001 www.mdpi.com/journal/viruses.

1.3. Epidemiologia e doenças relacionadas

As prevalências de infecções pelos HTLV-1 e HTLV-2 variam de acordo com a região geográfica, o grupo étnico e/ou racial e o comportamento de risco da população. O HTLV-1 é considerado endêmico em algumas regiões do Japão, Caribe, África, América do Sul e ilhas da Melanésia. Já o HTLV-2 é encontrado em indígenas nativos das Américas e em UDI de regiões urbanas dos Estados Unidos, Europa e América Latina (Gessain e Cassar, 2012; Carneiro-Proietti, 2015; Paiva e Casseb, 2015). O Brasil é considerado o país latino-americano que apresenta o maior número absoluto de pessoas infectadas por HTLV-1 e HTLV-2. Um estudo conduzido com base apenas em dados publicados estimou em até 800.000 pessoas infectadas pelo HTLV-1 no país (Gessain e Cassar, 2012). Porém, este número pode estar subestimado, e ser pelo menos o dobro, de acordo com o relatado por Willems e colaboradores (2017) e com os descritos em 2005, no Brasil, onde se estimou em 2 a 2,5 milhões de pessoas infectadas por HTLV no país (Catalan-Soares et al., 2005).

Já o HIV é o responsável pela pandemia de aids no mundo. Segundo a UNAIDS (*Joint United Nations Program on HIV/AIDS*, 2017), até o ano de 2016, 36,7 milhões de pessoas estavam infectadas com o vírus e, no Brasil, foram notificados de 1980 até junho de 2018, 926.742 casos da doença, 51,8% dos casos notificados foram da região Sudeste, (Brasil, Ministério da Saúde, 2018).

Embora geneticamente semelhantes, os HTLV-1 e HTLV-2 diferem na expressão de alguns genes/proteínas, principalmente da região *pX*. O HTLV-2, por exemplo, tem uma maior expressão de genes que favorecem a latência viral e menor expansão clonal que o HTLV-1 (Biswas et al., 2010; Ciminale et al., 2014; Melamed et al., 2014). Outra questão diz respeito às diferentes prevalências de acordo com o “grupo de risco”. Neste contexto, no Brasil, o HTLV-1 é encontrado principalmente em populações de afrodescendentes e japoneses, enquanto o HTLV-2 é mais frequente em UDI de regiões urbanas, infectados ou não pelo HIV-1 e em populações

indígenas (Paiva e Casseb, 2015). O desfecho clínico da infecção está associado ao *background* genético do hospedeiro, além de características dos vírus como tipo e carga viral (Assone et al., 2016).

Embora seja descrito que menos de 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolvam doenças hematológicas e/ou neurológicas graves como a ATLL e a HAM/TSP (Yoshida et al., 1982; Gessain et al., 1985), a alta letalidade e morbidade dessas doenças tornam importante o seu diagnóstico diferencial. O HTLV-2, embora menos associado a doenças, tem sido apontado como responsável por algumas manifestações neurológicas semelhantes à HAM/TSP, a doenças infecciosas e linfoproliferativas e a linfocitose (Montanheiro et al., 2008; Ciminale et al., 2014; Carneiro-Proietti, 2015). Já os HTLV-3 e HTLV-4 não foram associados a doenças, não tendo valor para a clínica médica até o presente.

Deve-se destacar no Brasil, que os estudos de morbidades associadas à infecção por HTLV-1 em coortes de infectados acompanhados por mais de 20 anos, revelam valores superiores aos descritos na literatura internacional, como relatado em estudo conduzido recentemente pelo Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV (GIPH) de Belo Horizonte, onde 22% dos infectados apresentaram alguma manifestação clínica relacionada ao HTLV-1, como lombalgia (n = 97,29%), fadiga (n = 85,25%), disfunção urinária (n = 80,24%), câibras (n = 76,23%), constipação intestinal (n = 69,20%), mialgia (n = 56,17%) e disfunção sexual (n = 51,15%) (Romanelli et al., 2018). Ademais, outras manifestações foram apontadas como uveítes, dermatites, miosites, além daquelas que reduzem a qualidade de vida do indivíduo como disfunção erétil e perda da libido, entre outras (Carneiro-Proietti et al., 2006; Caskey et al., 2007; Gessain et al., 2011).

A forma de aquisição do HTLV-1 também pode estar relacionada com doença; alguns estudos apontam que a HAM/TSP é favorecida pela transmissão sanguínea, enquanto a ATLL por via mucosa, durante o aleitamento materno (Lairmore et al., 2012; Futsch et al., 2018).

Outro fator importante envolvendo a transmissão dos HTLV é sua disseminação intrafamiliar silenciosa. Uma alta prevalência de portadores

dentro do domicílio é notada mundialmente; em regiões endêmicas esse percentual pode suplantar os 40% (Costa et al., 2013), ou seja, dificilmente haverá um portador solitário, e o principal vilão desta situação é o desconhecimento. Além disso, se considerados o intervalo de exposição e o período de latência, que são longos, os indivíduos infectados na infância, principalmente pela amamentação, tenderão a desenvolver a doença em plena fase produtiva da vida, acarretando problemas sociais, financeiros e psicológicos irreparáveis (Carneiro-Proietti et al., 2002; Santos et al., 2017).

Ainda, o impacto da infecção por HTLV-1 no indivíduo transcende o físico, revela-se também na “doença” emocional, como documentado por Gáscon et al. (2012), cujo estudo mostrou que portadores e pacientes, sobrevivem com medo de se tornarem incapazes e ter sua vida subtraída; desenvolvem ansiedade e depressão, o que piora as outras manifestações clínicas. Esses pacientes carregam consigo a incerteza de quando os sintomas poderão surgir e se agravar.

De fato, pouco se conhece sobre a transição de portador para doente e, além disto, não existe a cura, sendo o tratamento para a infecção por HTLV-1 apenas paliativo (Willems et al., 2017). Neste contexto, as únicas armas disponíveis são o conhecimento de seu *status* sorológico e a prevenção por bloqueio da transmissão.

A situação ainda é precária em todo o mundo, com uma estimativa de 20 milhões de pessoas infectadas (Willems et al., 2017). Desde a descoberta dos HTLV até o momento, muitos estudos foram realizados, informações preciosas foram obtidas, porém sem um impacto concreto em relação ao tratamento das doenças associadas ao HTLV. Pensando nisso, em 2014 foi criada uma força tarefa global (*The Global Virus Network*), com representantes de 11 países, incluindo o Brasil, com a missão de preencher esta lacuna. Dentre as ações e metas propostas constam: “(i) a triagem sistemática de indivíduos infectados pelo HTLV-1 para reduzir a transmissão; (ii) a identificação de biomarcadores para prever a progressão da doença e direcionar uma terapia personalizada; (iii) o desenvolvimento de vacinas e terapias eficientes”. Salientando a necessidade do envolvimento público-

privado, para este propósito (Willems et al., 2017). Mais recentemente foi instituído o Dia Mundial do HTLV: 10 de Novembro pela Associação Internacional de Retrovirologia (IRVA – *International Retrovirology Association*) objetivando informar e mobilizar a sociedade e o poder público para o significado da infecção pelo HTLV-1, as doenças a ele relacionadas, seu impacto na saúde pública e os meios de contê-lo (Caterino-de-Araujo, 2018). Ainda, foi elaborado o Guia de Manejo Clínico de HAM/TSP (IRVA, 2018) e atualizado o Guia de Manejo Clínico de ATLL (Cook et al., 2019), ambos disponíveis no site da IRVA (<https://htlv.net>).

Digno de nota, no Brasil, a infecção por HTLV-1/2 é negligenciada, não consta sequer do rol de doenças, não é de notificação compulsória e tampouco sua sorologia é recomendada para gestantes durante o pré-natal e para populações vulneráveis (UDI, pessoas privadas de liberdade, homens que fazem sexo com homens, travestis e transexuais, moradores de rua, entre outros). Apenas para os infectados pelo HIV o MS recomenda a realização da sorologia para HTLV ao menos uma vez, durante o seguimento do paciente (Brasil - MS, 2014).

1.4. Coinfecções

A coinfecção por retrovírus humanos (HIV/HTLV) é frequente em população vulnerável, como UDI e nesta população a coinfecção HIV/HTLV-1 tem sido apontada como responsável pela evolução mais rápida para aids e menor sobrevida dos pacientes (Brites et al., 2001, 2009), ao contrário do que ocorre na coinfecção HIV/HTLV-2 em que o HTLV-2 parece desempenhar um papel protetor na evolução para aids (Turci et al., 2006; Casoli et al., 2007; Beilke, 2012). Brites et al. (2009), relataram que o aumento de células T CD4+ na coinfecção HIV/HTLV-1, não reflete um sistema imune competente; ainda, Ticona et al. (2013) descreveram aumento de 2,5 vezes de predisposição à tuberculose em áreas endêmicas nos coinfectados. Já a coinfecção por outros vírus como os das hepatites B

e C (HBV e HCV) vêm sendo estudadas em todo o mundo e mostram resultados discordantes em relação à evolução da hepatite C. No Brasil, a coinfeção HCV/HTLV-1 foi relacionada com melhor evolução da hepatite C [menor carga viral (CV) de HCV, clareamento espontâneo de HCV e menos lesão hepática], ao contrário do que foi observado em outros países que encontraram mais casos com evolução para cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e menor sobrevida dos coinfectados (Moreira et.al, 2013; Castro e Roger, 2016). Curiosamente, um estudo conduzido em São Paulo descreveu maior CV de HCV nos casos de coinfeção HCV/HIV, HCV/HTLV-1 e HCV/HIV/HTLV-1, contrapondo-se aos resultados obtidos em outros estudos conduzidos no Brasil (Alves et al., 2018).

Em relação à coinfeção HCV/HTLV-2, embora um estudo realizado nos EUA tenha mostrado maior CV do HCV na coinfeção HTLV-2 e/ou HIV (Hisada et al., 2003), em São Paulo, foi detectada menor CV de HCV na coinfeção HCV/HTLV-2 quando comparada a monoinfeção HCV (Alves et al., 2018). O mesmo foi observado por Ruiz-Mateos e colaboradores na Espanha, onde em UDI infectados pelos HIV e HTLV-2 foi detectada menor CV de HCV e maior percentagem de linfócitos T CD8+ em pacientes que controlaram a infecção por HIV (Ruiz-Mateo et al., 2019). Questões relacionadas ao *background* genético dos pacientes, bem como as características das populações de estudo e aos subtipos de HTLV-2 que circulam em São Paulo e Espanha em relação aos EUA, podem ter sido a causa dos resultados discordantes obtidos, como apontados por Alves et al. (2018) e Ruiz-Mateos et al. (2019) .

Quanto à coinfeção HBV/HTLV-1/-2 muito pouco se sabe sobre seu impacto na hepatite B havendo apenas um trabalho que relata maior quantidade de antígeno de superfície do HBV (HBsAg) na coinfeção HBV/HTLV-1 (Marr et al., 2017), porém sabe-se que esta coinfeção é frequente em população com HIV/aids no Brasil (Caterino-de-Araujo et al., 2015; Alves, 2018).

De todo modo, um fato que merece ser destacado é a alta prevalência das coinfeções por HTLV, nas populações infectadas por HIV,

HBV e HCV de São Paulo. De fato, nos últimos anos foram encontradas prevalências de 3,6%, 1,3% e 5,3% de coinfeção HIV/HTLV, HBV/HTLV e HCV/HTLV, respectivamente, em São Paulo (Campos et al., 2017; Caterino-de-Araujo et al., 2018). Corroborando estes dados, outro estudo conduzido em 2015 em São Paulo mostrou forte associação da infecção por HTLV e UDI (OR 30.01), HCV (OR 24.4) e HBV (OR 4.27) (Caterino-de-Araujo et al., 2015).

1.5. Diagnóstico Laboratorial

Atualmente, o diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 se inicia pela pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos virais presentes no soro ou plasma dos pacientes (triagem sorológica), utilizando ensaios de aglutinação de partículas (PA, *particle agglutination*), ensaio imunoenzimático (EIA, *enzyme immunoassay* ou ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*) ou quimioluminescência (CLIA, *chemiluminescent assay*). Amostras de soro/plasma reagentes nos testes de triagem são submetidas aos testes confirmatórios de *Western Blot* (WB) ou imunoensaio de linha (LIA, *line immunoassay*). Uma alternativa aos testes confirmatórios sorológicos são os testes moleculares que detectam presença de segmentos do genoma proviral destes vírus em células do sangue periférico. São eles: a reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) seguida ou não da pesquisa de sítios de restrição enzimática (RFLP, *restriction fragment length polymorphism analysis*), e a PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR).

O teste de aglutinação emprega partículas de látex ou de gelatina adsorvidas com antígenos do lisado viral de HTLV-1. É uma técnica rápida, sensível e de fácil execução, sendo empregada principalmente no Japão, onde circula apenas o HTLV-1. Foi uma das primeiras técnicas descritas para triagem de infecção por HTLV-1 após o surgimento de casos de ATLL

em Kyushi, no Japão. Não é uma técnica de escolha para o Brasil, pois este país é uma região endêmica para HTLV-1 e HTLV-2 (Paiva e Casseb, 2015).

Em 1988, o *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, licenciou o primeiro *kit* para a detecção de anticorpos dirigidos ao HTLV-1, usando a técnica EIA, e este ensaio foi recomendado para a triagem de doadores de sangue e para a avaliação de pacientes com diagnóstico clínico sugestivo de ATLL e de HAM/TSP (CDC, 1990; CDC, 1998). Os testes EIA de primeira geração empregavam como antígeno, lisado viral total do HTLV-1, porém devido à similaridade genética de 60% entre o HTLV-1 e HTLV-2, eles também foram usados na triagem sorológica de HTLV-2 (Jacob, 2007; Caterino-de-Araujo, 2009). No entanto, a sensibilidade não era boa e os testes foram posteriormente acrescidos de lisado viral total de HTLV-2 ou de proteína recombinante do envelope comum a ambos os vírus, a gp21 (rgp21), configurando os testes sorológicos de segunda geração (Jacob, 2007; Caterino-de-Araujo, 2009). Com isso, houve melhora na sensibilidade de detecção da infecção por HTLV-2, que atingiu 93,8%. Ademais, para melhorar ainda mais a sensibilidade de detecção de HTLV-1 e HTLV-2, foram introduzidos os testes de terceira geração, que empregam apenas proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos e usam a configuração conhecida como sanduiche, onde tanto na fase sólida aderida à placa como no conjugado, são utilizados os mesmos antígenos. Apesar destas mudanças, não existe um teste EIA que seja 100% sensível e específico para detectar todos os casos verdadeiramente positivos de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, no Brasil (Jacob et al., 2007, 2008; Campos et al., 2017).

Mais recentemente, para a triagem sorológica de HTLV-1 e HTLV-2 foram desenvolvidos os testes de quimioluminescência (CLIA) em sistema automatizado. Eles contêm partículas magnéticas recobertas com peptídeos sintéticos da membrana de HTLV-1 e HTLV-2 (gp46-I e gp46-II) e proteína recombinante da porção transmembrana do envelope destes vírus (rgp21). É um teste de alta sensibilidade, porém pode apresentar menor especificidade em relação a outros testes de triagem (da Silva Brito et al.,

2018); vêm sendo empregado principalmente em bancos de sangue e grandes laboratórios no Brasil e no exterior.

Quanto aos testes sorológicos confirmatórios, os primeiros foram o WB e a imunofluorescência indireta (IFI), sendo a IFI um teste *in house* e o WB disponível no comércio. Várias versões do WB foram feitas, inicialmente usando lisado viral do HTLV-1, posteriormente acrescentando-se proteína recombinante dos envelopes dos HTLV-1 e -2 [rgp46-I (MTA-1) e rgp46-II (K-55)] e uma proteína recombinante transmembrana comum aos HTLV (rgp21e), e finalmente uma versão melhorada da rgp21e denominada GD21 (WB 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore) (Caterino-de-Araujo, 2009). No entanto, apesar das modificações observou-se falha no diagnóstico sorológico de casos verdadeiramente infectados, principalmente pelo HTLV-2 (De-Araujo et al., 1994; Gallo et al., 1994; Casseb et al., 1997; Caterino-de-Araujo et al., 1998; Morimoto et al., 2007; Campos et al., 2017). Além disto, o WB possui alto custo, em alguns casos não diferencia os tipos virais, e resulta em padrão inconclusivo/indeterminado em mais de 30% dos casos com a coinfeção pelo HIV (Jacob et al., 2008).

Na tentativa de melhorar o diagnóstico sorológico confirmatório foi introduzido o LIA, que é composto por tiras de nylon dotadas com proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos do HTLV-1 e HTLV-2 e que permite distinguir entre os dois tipos virais (Sabino et al., 1999). Este teste vem sendo usado com maior frequência no Brasil nos últimos anos, por ter mostrado ser mais sensível que o WB em confirmar a infecção por HTLV e discriminar infecção por HTLV-1 de HTLV-2 (Sabino et al., 1999; Silva, 2011; Campos et al., 2017). No entanto, há que se destacar que no Brasil, a maioria dos laboratórios utiliza o WB, tanto na rotina como em pesquisa. Isto porque, o WB apresentava custo inferior ao LIA, fato que não acontece no momento atual.

Porém, pelos problemas apontados anteriormente, testes moleculares foram propostos para o diagnóstico confirmatório e discriminatório dos HTLV, incluindo os HTLV não tipados ou indeterminados à análise pelo WB. Uma variedade de testes foi descrita, buscando por

segmentos de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 (Costa, 2010; Costa et al., 2011; Gessain e Cassar, 2012; Ishihara et al., 2014; Kuramitsu et al., 2017). No entanto, não houve uma uniformização dos segmentos que deveriam ser pesquisados, tampouco houve padronização de *primers* e protocolos de reação. A diversidade de protocolos, regiões a serem pesquisadas, objetivo das pesquisas são apresentados no **Quadro 1** em anexo.

A PCR apresenta vantagens em relação aos testes sorológicos, pois é capaz de detectar baixas concentrações de patógenos; uma das características das infecções por HTLV-1/-2, que não apresentam ou apresentam baixíssima viremia plasmática e o material genético viral está inserido no DNA da célula hospedeira na forma de provírus (Cabral et al., 2012).

Resumidamente, a PCR consiste na amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA que são sintetizadas pela ação de uma polimerase resistente a variações de temperatura (Sambrook e Russel, 2001). Há muitos métodos *in house* com diferentes protocolos e modelos desta reação. Um dos modelos que tem se destacado para detectar agentes infecciosos pela sua praticidade é a qPCR. Esta metodologia emprega um sistema de sonda fluorescente acrescida aos iniciadores (*primers*) que reconhecem sequências específicas no DNA alvo e emitem um sinal luminoso sinalizando o ciclo no qual este alvo é amplificado (Cq, *cycle of quantification*), (Higuchi et al., 1993; Marras et al., 2002).

A maioria das sondas são compostas por uma molécula fluorescente (denominada de *Reporter*) na extremidade 5' e uma molécula bloqueadora (denominada de *Quencher*) na extremidade 3'. A proximidade dessas moléculas inibe a liberação da fluorescência, porém quando separadas há a emissão. Isto ocorre pela ação lítica da *Taq* DNA polimerase, que hidrolisa a sonda ligada a molécula de DNA alvo no momento exato em que o amplicom é produzido (Marras, 2008).

Existem vários sistemas de sondas de PCR em tempo real, porém levando em consideração o custo e aplicabilidade, as sondas de hidrólise comercialmente conhecidas como sistema TaqMan®, são as mais utilizadas.

Também é possível utilizar o corante SybrGreen, que se intercala entre as duplas fitas de DNA, durante a sua replicação (Marras, 2008).

De destaque, nos últimos anos foi desenvolvida a qPCR digital (dqPCR) que é mais sensível em relação às outras PCR, porém ainda não é de uso corriqueiro. Na Suécia foi padronizada para determinação de CPV de HTLV-1 e HTLV-2; no Japão, ela vem sendo utilizada para determinação de CPV de HTLV-1, e na Austrália para diagnóstico de bronquiectasia associada ao HTLV-1c (Hedberg et al., 2018; Kuramitsu et al., 2018; Yurick et al., 2019).

Resumindo, não há um consenso, sobre qual teste confirmatório deverá ser utilizado no algoritmo diagnóstico dos HTLV-1/-2, tampouco um padrão ouro reconhecido. Pela praticidade e disponibilidade no mercado o WB é o mais referido (Campos et al., 2015). No entanto, para laboratórios que dispõem de infraestrutura e aplicação rotineira de PCR, a proposta de sua introdução no algoritmo laboratorial para os HTLV, vem sendo avaliada.

Até o momento não há testes comerciais disponíveis no mercado nacional, embora em 1997 tenha sido produzido um teste pela Roche (Amplicor HTLV-I/II – Roche), que não teve continuidade de produção (Vrieland et al., 1997). Os testes *in house* de PCR não foram validados para amostras de casos de infecção de todo o território nacional, desta forma, diferentes protocolos e modelos foram desenvolvidos de acordo com a disponibilidade de equipamentos e acesso a insumos, o que dificulta uma análise comparativa entre eles (**Quadro 1** em anexo).

Em estudo anteriormente conduzido por Costa et al. (2011) no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL), foram padronizados três ensaios de PCR em tempo real (qPCR) em formato individual (*single*) para identificação dos segmentos *pol* do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2 e de segmento do gene da albumina humana, os quais se mostraram úteis na elucidação de amostras da rotina diagnóstica do IAL, com perfil indeterminado ou HTLV não tipado pelo WB.

Considerando os altos gastos de reagentes e de material clínico do paciente para a realização dos três ensaios *single*, a padronização de um

ensaio *multiplex* para a detecção simultânea dos três genes alvos tornou-se uma estratégia interessante e necessária. Além disso, seria importante padronizar o ensaio *multiplex* em diferentes plataformas para ser empregado em diferentes equipamentos de qPCR e com diversas marcas de reagentes disponíveis no comércio, permitindo assim, seu repasse para outros Laboratórios de Saúde Pública do país (LACEN).

Pela experiência acumulada no diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 e por se dispor de uma equipe altamente qualificada em técnicas moleculares e um Laboratório padrão internacional de Biologia Molecular no Centro de Imunologia do IAL decidiu-se realizar o presente estudo, com vistas a fornecer mais um teste confirmatório para compor o algoritmo de testes laboratoriais de diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, que seja seguro, de baixo custo e de fácil execução, e que possa ser usado em qualquer Laboratório de Saúde Pública do país.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Padronizar e avaliar o desempenho de duas qPCR em formato *multiplex* (XqPCR) para detecção simultânea de segmento proviral de HTLV-1, HTLV-2 e do gene da albumina humana em plataforma aberta.

2.2. Específicos

- Otimizar o ensaio de XqPCR *pol* partindo da padronização da qPCR *pol* no formato *single*, variando a concentração de *primers*, sondas e tipo de reagente de *master mix*;
- Padronizar a XqPCR HTLV para um segundo alvo genético de HTLV-1 e HTLV-2 (*tax*);
- Desenhar e avaliar genes sintéticos (plasmídeos) com as sequências alvos do gene *tax* e albumina para o HTLV-1 e HTLV-2 para serem usados como padrões nos ensaios de XqPCR HTLV;
- Avaliar os ensaios de XqPCR HTLV em duas plataformas de qPCR e com diferentes reagentes comerciais;
- Determinar a sensibilidade/limite mínimo de detecção dos ensaios XqPCR HTLV;
- Determinar a especificidade dos ensaios XqPCR HTLV e verificar sua reprodutibilidade;
- Comparar o desempenho das XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) na detecção e identificação de infecções pelo HTLV-1/-2 frente ao WB em pacientes infectados ou não pelo HIV;
- Avaliar a aplicação da XqPCR HTLV na quantificação da carga proviral durante seguimento de pacientes com a infecção por HTLV-1/-2.

3. MATERIAL

3.1. Amostras de estudo

3.1.1. Critério de inclusão e exclusão

Amostras de sangue coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilenodiaminotetracético), provenientes de pesquisas e da rotina diagnóstica de infecção por HTLV-1/2 do IAL, dos anos de 2012 a 2018, de indivíduos com 18 anos ou mais, foram incluídas no estudo. Amostras que não atenderam estes critérios foram excluídas da pesquisa.

3.1.2. Grupos de estudo

Grupo 1. Amostras de sangue ou DNA de 39 indivíduos, negativos para a infecção por HIV e que resultaram positivos para a infecção por HTLV-1/2 na triagem sorológica. Destes, 29 procedentes de Ambulatório de HTLV ou Banco de Sangue de Recife-PE, e 10 da rotina diagnóstica de infecção por HTLV-1/2 do IAL. Grupo usado para o cálculo de sensibilidade diagnóstica das XqPCR HTLV em população sem a infecção pelo HIV.

Grupo 2. Amostras de sangue de 152 indivíduos, positivos para a infecção por HIV/aids e que resultaram positivos na triagem de infecção por HTLV-1/2; 104 da rotina diagnóstica do IAL e 48 de projeto de pesquisa junto ao CRT-DST/aids-SP. Grupo usado para o cálculo de sensibilidade diagnóstica das XqPCR HTLV em população infectada pelo HIV. Dependendo do volume de DNA extraído, 25 amostras deste grupo foram usadas na otimização da XqPCR *pol* e 10 nos ensaios de precisão. Para a

quantificação de CPV de HTLV-1/-2 foram avaliadas amostras de sangue coletadas durante o seguimento de 16 pacientes do CRT-DST/aids-SP.

Grupo 3. Amostras de sangue de 30 pacientes, negativos na triagem de infecção por HTLV-1/2, todos do CRT-DST/aids-SP, sendo 22 com a monoinfecção HIV, dois com a coinfeção HIV/HBV, três com a coinfeção HIV/HCV e três com a tripla infecção HIV/HBV/HCV. Estas amostras foram empregadas para o cálculo de especificidade analítica e diagnóstica das XqPCR HTLV.

3.1.3. Aspectos Éticos

As amostras biológicas utilizadas neste estudo se referem a projetos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Conselho Técnico Científico do IAL (CEPIAL e CTC-IAL) #106D/2013 e #62H/2015 e estão cadastrados na Plataforma Brasil com os números CAAE #11302512.0.0000.0059 e #52493316.1.0000.0059, estando em acordo com a Resolução Nº 466 de 12/2012 do Conselho Nacional de Saúde e da Declaração de Helsinque e de suas complementares.

As amostras de DNA procedentes de Ambulatório de HTLV ou Banco de Sangue de Recife-PE, positivas para HTLV-1, foram cedidas pela Profa. Dra Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura da Universidade de Pernambuco (UPE), que autorizou sua utilização nesta pesquisa, uma vez que elas haviam sido encaminhadas ao IAL para um estudo de caracterização molecular de HTLV-1 (Números de Acesso em GenBank: KY928459-KY928480 (*env*); KY928511-KY928512 (LTR); KY928553-KY928574 (*tax*); KY928575-KY928576 (*tax*); MF178246-MF178269 (LTR).

Todas as amostras biológicas estavam sob a guarda/responsabilidade de Adele Caterino de Araujo, armazenadas na sala 1119, 11º andar, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, em freezer -20 °C.

3.1.4. Extração de DNA humano e DNA proviral

Resumidamente foram obtidas amostras de sangue coletado em tubo contendo o anticoagulante EDTA, que após sedimentação espontânea das hemácias foi separado em plasma e leucócitos do sangue periférico (PBL, *peripheral blood leukocytes*). O plasma foi armazenado para os ensaios sorológicos e os PBL congelados para posterior extração de DNA. Para os testes de quantificação (cópias de provírus), as células mononucleares (CMN) foram separadas usando gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque (Sigma Aldrich), e diluídas para a concentração de 1×10^6 células/100 μ L, após contagem em câmara de Neubauer. As extrações de DNA dos PBL e CMN foram realizadas no sistema robotizado, extrator MagNA Pure LC 2.0, empregando-se o *kit* MagNA Pure LC DNA isolation kit I - High Performance, ambos da marca Roche Diagnostics GmbH – Roche Applied Science-Mannheim, Germany, conforme orientação do fabricante, com eluição final de 100 μ L. Ressalta-se que este material biológico humano era finito, e não pode ser utilizado em todas as etapas de padronização das técnicas de qPCR *multiplex*, sendo destinado aos cálculos de sensibilidade e especificidade diagnósticas relativas, e para CPV.

Há que se destacar que as amostras de sangue utilizadas neste estudo foram triadas quanto à infecção por HTLV-1/2 por dois ensaios imunoenzimáticos de terceira geração, o Gold ELISA HTLV I+II (REM-SP, BR) e o Murex HTLV I+II (Diasorin, UK) e confirmadas pelo teste de *Western Blot* (WB - HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals, Asia Pacific Pte. Ltd), utilizado como método de referência e, em alguns casos, pelo imunoensaio de linha (INNO-LIA HTLV-I/II, Fugirebio, Bélgica).

3.2. Padronização dos ensaios

3.2.1. Plasmídeos pHTLV1-Alb e pHTLV2-Alb

Para as etapas de padronização e otimização foram empregados plasmídeos com dupla inserção, devido a escassez de volume das amostras clínicas. O plasmídeo pHTLV1-Alb, gentilmente cedido pelo Dr. Jorge Casseb do IMT/FMUSP, foi construído por meio de clonagem da região *pol* do HTLV-1, entre as posições 4708 e 4953, fragmento com 246pb, e da porção do intron12 do gene da albumina humana entre as posições 15758 e 16940, fragmento de 171 pb, no vetor plasmidial pcDNA 3.1, de acordo com Dehée et al. (2002). O plasmídeo pHTLV2-Alb, foi desenhado e gentilmente cedido pela Dra. Marina Lobato Martins da Universidade Federal de Minas Gerais; consiste de um DNA sintético de 320 pb, clonado no vetor pENO8H, contendo um fragmento de 138 pb do gene *pol* do HTLV-2, posições 4720 a 4856, e um fragmento de 171 pb do gene da albumina humana descrito por Dehée et al., 2002.

Para o segmento *tax* (região *pX*) os plasmídeos foram desenhados no IAL pela Dra. Lucila Okuyama Fukasawa, empregando-se o software versão 2.3 do programa Primer Express, da Applied Biosystems e sintetizados pela Life Technologies Brasil, no vetor plasmidial pMA-T, designados: HTLV1_ *tax*-Alb; um DNA sintético de 321pb, entre as posições 7336 e 7486, e o HTLV2_ *tax*-Alb, fragmento de 297pb, entre as posições 7252 e 7327, ambos contendo o fragmento de 171 pb do gene da albumina humana descrito por Dehée et al. (2002).

Estes plasmídeos foram expandidos no IAL em células *Escherichia coli* DH5a em meio Luria Bertani (LB) contendo 0,2 mg/mL de ampicilina, extraídos e purificados empregando-se o QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). As sequências dos insertos clonados foram confirmadas através de reação de sequenciamento no equipamento ABI 3130xl, comparando-se com as sequências de referência do GenBank J02029, M10060 e M12523, para HTLV-1, HTLV-2 e Albumina, respectivamente.

A concentração dos plasmídeos (em ng/mL) foi determinada no equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Os plasmídeos foram empregados para uso como controles positivos de reação, na construção da curva-padrão e para o cálculo de limite mínimo de detecção (LMD) e de quantificação (LMQ) e para o cálculo de cópias provirais por μL de amostra.

3.2.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O reagente ROX foi acrescentado à solução da reação, quando esta não a continha, para o emprego na plataforma ABI, na qual este reagente tem a função de normalizador da fluorescência, ou referência passiva, sendo uma exigência do fabricante. Quanto a concentração deste componente, há a recomendação na bula da *master mix* de cada fabricante e geralmente varia entre 25-50 nM. Para outras plataformas como a ROCHE, BioRad, dentre outras, não há necessidade de sua inclusão, mas caso esteja presente na formulação do reagente, estes podem ser utilizados sem prejuízo a reação.

As ciclagens foram realizadas nos aparelhos LightCycler II 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind.) e Applied Biosystems modelo 7.500 (Foster City, CA, USA).

Quanto aos parâmetros de amplificação, foi testada a ciclagem universal, presente em todas as plataformas (2 minutos a 50 °C; 10 minutos a 95 °C; e repetição de 50 ciclos com 15 segundos a 90 °C e 1 minuto a 60 °C). Porém, esses parâmetros não mostraram bom resultado, apenas para o componente albumina da XqPCR_*pol* na plataforma ABI, não ocorrendo na plataforma Roche, tampouco para a XqPCR_*tax*. Também foram realizadas alterações no tempo de decaimento de temperatura por segundo (rampa) entre os ciclos na plataforma ABI no protocolo universal, mas sem melhoras significativas, bem como nos parâmetros descritos por Waters et al., 2011.

Assim sendo, foram escolhidos os parâmetros que se aplicaram as duas XqPCR nas diferentes plataformas, ficando definido: 1 ciclo de 2

minutos a 50 °C (ativação da enzima UNG); 10 minutos a 95 °C; e repetição de 50 ciclos com 50 segundos a 90 °C e 1 minuto a 60 °C (fase de coleta de dados), o mesmo empregado por Tamegão-Lopes et al., 2006, Costa, 2010 e Costa et al., 2011. Ao final da corrida foi estabelecido um valor de corte para determinar a positividade, observando-se a curva exponencial e a compatibilidade dos multicomponentes [cada um dos sinais fluorescentes, incluindo a referência passiva (ROX)]. Foram incluídos em cada reação dois poços de controle sem DNA.

3.2.3. Otimização do ensaio de XqPCR HTLV_*pol*

Para a realização da XqPCR HTLV_*pol* foi utilizado o sistema sondas de hidrólise (TaqMan®) para as três sequências alvo: os segmentos *pol* do genoma proviral de HTLV-1, de HTLV-2 e segmento do gene da albumina humana como referência, funcionando como um controle interno da reação, e confirmando a presença de DNA genômico humano de boa qualidade.

A escolha dos oligonucleotídeos baseou-se no desempenho em termos de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade relatadas por Costa, 2010 e Costa et al. 2011. Pequenas modificações nas sequências das sondas, devido à mudança nas marcações das químicas fluorescentes, foram efetuadas; isto para adequar o protocolo *single* empregado anteriormente para o desenvolvimento do ensaio no formato *multiplex* (dados apresentados em resultados, **Quadro 3**).

3.2.4. Padronização do ensaio de XqPCR HTLV_*tax*

Para a padronização da XqPCR HTLV com o segundo alvo *tax* (região *pX*), seguiu-se o mesmo sistema e marcação de sondas da XqPCR HTLV_*pol*. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos alvos *tax-1* para

o HTLV-1 e *tax-2* para o HTLV-2 foram os descritos por Takenouchi et al., 2011 e Waters et al., 2011, respectivamente, mantendo-se a escolha do mesmo gene de referência empregado na XqPCR HTLV_*pol* (Dehée et al., 2002); todos escolhidos com base no desempenho quanto a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade descritos pelos autores (dados apresentados em resultados, **Quadro 5**).

Com o propósito experimental, foi testado um novo modelo na marcação da sonda do gene de referência, com o emprego de duas moléculas bloqueadoras (*quencher*), um interno (*quencher* ZEN) e uma nova química no *quencher* externo, e a mesma marcação anterior para o gene de referência, sem alteração no resultado final, reduzindo apenas os sinais inespecíficos/ruídos de reação, possibilitando a escolha das duas versões apresentadas.

3.2.5. Especificidade dos oligonucleotídeos

Para assegurar a especificidade dos oligonucleotídeos e sua capacidade em parear com sequências de DNA proviral de isolados de HTLV-1 e HTLV-2 do Brasil, foi realizada uma pesquisa, submetendo sequências brasileiras juntamente aos protótipos internacionais [cepas de referência de HTLV-1 (ATK, Número de Acesso em GenBank J02029) e HTLV-2 (MoT, Número de Acesso em GenBank M10060)] ao Banco de Dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), usando o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e buscando por alterações de nucleotídeos.

3.2.6. Concentração dos oligonucleotídeos: Iniciadores (*Primers*), Sondas (*Probes*) e Ciclagens

A padronização das concentrações dos iniciadores, senso (F) e antissenso (R), para a XqPCR HTLV foram determinadas testando-se as concentrações entre 200-900 nM e entre 100-300 nM para as sondas, escolhendo-se a menor concentração capaz de produzir o melhor sinal de detecção com menor ciclo de amplificação detectável, após análise detalhada de todas as curvas de amplificação e liberação de fluorescência. Para isso procedeu-se da seguinte maneira: fixou-se a concentração da sonda em 100 nM para todos, variando as concentrações dos oligonucleotídeos (iniciadores) senso (F) nos orifícios horizontais (linha) e do antissenso (R) nos orifícios verticais (coluna), conforme esquema apresentado no **Quadro 2**.

Quadro 2. Esquema das concentrações empregadas na padronização dos oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) utilizados na padronização das XqPCR HTLV.

	1	2	3	4
A	F200	F200	F200	F200
	R200	R300	R600	R900
	Pb100	Pb100	Pb100	Pb100
B	F300	F300	F300	F300
	R200	R300	R600	R900
	Pb100	Pb100	Pb100	Pb100
C	F600	F600	F600	F600
	R200	R300	R600	R900
	Pb100	Pb100	Pb100	Pb100
D	F900	F900	F900	F900
	R200	R300	R600	R900
	Pb100	Pb100	Pb100	Pb100

Legenda: F = *Forward* (senso); R = *Reverso* (antissenso); Pb = *Probe* (sonda)

Findo a determinação da concentração ótima dos iniciadores senso e antissenso, procedeu-se de maneira similar a determinação da concentração da sonda, mantendo-se fixas as concentrações dos iniciadores, agora

escolhidos de acordo com a concentração ótima pré-definida para cada gene.

Após vários testes avaliando diferentes concentrações dos componentes da PCR, iniciadores e sondas para a reação de XqPCR HTLV, foram escolhidas as combinações que resultaram melhor sinal de leitura (curva de amplificação e fluorescência), menores sinais de fundo/ruído (*baseline/background*) e melhor definição entre positivos e negativos.

Alguns ajustes adicionais foram realizados e foram definidas as concentrações dos oligonucleotídeos para o estudo. Há que se ressaltar que os volumes dos iniciadores podem ser adequados, se necessários, desde que a concentração final da reação permaneça fixa; para tal, basta o emprego da fórmula de diluições para misturas proporcionais. Exemplo: 0,5 µL de 10,4 µM = 208 nM final (dados apresentados em resultados, **Quadro 4**).

Nesta etapa um volume total de reação de 25 µL foi utilizado, composto de 5 µL de DNA plasmidial pré-diluído a 1/1 milhão, 1X *Master Mix*, 2 µL de cada um dos oligonucleotídeos nas concentrações propostas, 0.4 µL de ROX Low e água q.s.p. grau PCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind).

3.2.7. Determinação da concentração de plasmídeos para serem usados como controles positivos de reação

Inicialmente foram avaliadas as diluições 1/mil e 1/milhão a partir da concentração original de cada plasmídeo, para posteriormente serem determinadas as melhores concentrações a serem utilizadas como controles positivos das reações de XqPCR HTLV, destacando-se que estas diluições correspondem a aproximadamente 10 ng/uL em 10³ e 10 pg/uL em 10⁶, dos plasmídeos com insertos de fragmentos do gene *tax* dos alvos HTLV-1 e HTLV-2 e do gene de referência (Albumina)

Conforme mostra a **Figura 4**, as curvas de amplificação obtidas empregando-se Kappa Probe Fast qPCR Kit *Master Mix* Universal (Kappa

Biosystem), apresentaram ciclos de quantificação de fluorescência (Cq) de aproximadamente 17 e 27 para a composição HTLV-1/Alb e 18 e 28 na composição HTLV-2/Alb, nas diluições 1/mil e 1/1 milhão, respectivamente.

Notar também que as curvas de amplificação se apresentaram em formato sigmoidal, típicas de amplificação positiva pelo sistema TaqMan (em vermelho), e que as trações de ruído (*background*) que aparecem em verde caracterizam ausência de amplificação, ambas separadas pela linha limítrofe (*threshold*), a qual determina o nível de fluorescência onde a reação é detectada (ciclo) na fase exponencial de amplificação do DNA.

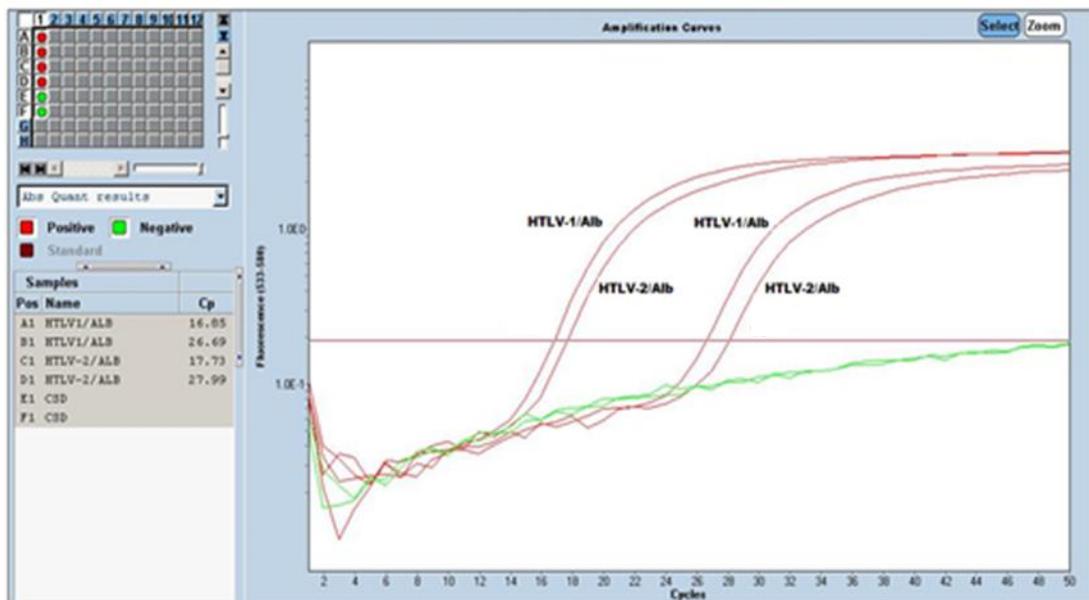


Figura 4. Curvas de amplificação da qPCR HTLV_*tax* usando plasmídeos HTLV-1/Alb e HTLV-2/Alb e diluição 1/mil e 1/1 milhão.

Legenda: Cq, ciclo de amplificação; 10^3 e 10^6 correspondem as concentrações de 10 ng/uL e 10 pg/uL de plasmídeos com insertos de fragmento de gene da albumina humana e *tax* de HTLV-1 e HTLV-2.

3.2.8. Cálculo do número de cópias dos plasmídeos

Os cálculos das concentrações dos plasmídeos foram obtidos após dosagem no equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo

Scientific) e aplicação da constante de Avogadro para conversão em número de cópias por microlitros.

Partindo da solução estoque foram realizadas as diluições seriadas na base 10 a fim de obter as concentrações de 10^6 a 10^0 cópia de plasmídeo em 5 μL . As concentrações iniciais determinadas para cada um dos plasmídeos foram: $2,801 \times 10^{10}$ cópias/ μL para o alvo *pol*/HTLV-1/Albumina, $6,14 \times 10^{11}$ cópias/ μL para o alvo *pol*/HTLV-2/Albumina, $2,065 \times 10^{10}$ cópias/ μL *tax* HTLV-1/Albumina e $1,074 \times 10^{10}$ cópias/ μL para o alvo *tax* HTLV-2/Albumina.

3.2.9. Estabilidade da curva padrão

Devido à possibilidade de emprego da XqPCR HTLV na quantificação da CPV de pacientes infectados pelos HTLV-1/2, e de que alterações de temperaturas, exposição luminosa, entre outros, podem eventualmente promover a degradação, evaporação e alterar a qualidade ou concentração dos plasmídeos, foi avaliada a estabilidade das concentrações dos plasmídeos para a confecção da curva padrão de referência, ressaltando que para esta aplicação estudos de precisão com relação ao limite mínimo de quantificação (LMQ) são necessários (Rabenau et al., 2007; ANVISA-RE 899/29/5/03).

A estabilidade das diluições/concentrações dos plasmídeos empregados na curva padrão foi verificada após cinco ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento. As diluições dos plasmídeos foram realizadas com solução de TE pH 8,0 (Ambion).

3.3. Avaliação dos ensaios de XqPCR- Indicadores de desempenho

3.3.1. Linearidade: Comparação entre os formatos *single* e *multiplex* para os alvos *pol* e *tax* pela curva padrão

A linearidade é determinada pela absorção da fluorescência (intensidade de luz) proporcionalmente a variação constante da concentração do DNA, presente na mistura da solução, seguindo a Lei de Lambert e Beer.

Para determinar a linearidade dos ensaios XqPCR HTLV (*pol* e *tax*), frente à formatação *single* e *multiplex* foram realizadas diluições seriadas para construção da curva padrão e comparadas a capacidade de responder a pequenas alterações nas concentrações do analito. O objetivo foi simular diferentes concentrações de DNA proviral presentes nas amostras e verificar se a sensibilidade analítica nos dois formatos era equiparável.

3.3.2. Avaliação da eficiência/sensibilidade do ensaio

Com o intuito de avaliar a eficiência e o limite mínimo de detecção (LMD) da reação de amplificação de cada gene-alvo no ensaio *multiplex* foram realizadas diluições seriadas de plasmídeos contendo o segmento gênico de interesse, com número de cópias conhecidas/diluição, que foram submetidos à amplificação.

As matrizes concentradas de plasmídeos foram diluídas em solução de Tris-EDTA (10 mM Tris, 1mM EDTA) pH 8,0 compondo 7 pontos na base 10.

Foram empregados 5 µL/reação de cada concentração conhecida de plasmídeo em reações no formato *single* e *multiplex* para cada gene alvo na plataforma ROCHE LC 480I e/ou ABI 7.500 empregando-se o reagente Kappa Probe Fast qPCR Kit *Master Mix* Universal (Kappa Biosystem).

O gráfico gerado pela concentração de cada plasmídeo e os respectivos valores do Cq foi empregado para o cálculo da equação de regressão linear e a correlação entre as variáveis pelo R-quadrado e precisão.

3.3.3. Especificidade analítica e diagnóstica do ensaio

Para confirmar a ausência de reação cruzada e/ou resultados falsos positivos devido ao compartilhamento de vias de infecção viral e/ou similaridade genética entre vírus, assegurando a veracidade do resultado do teste proposto, foram avaliadas 30 amostras de DNA provenientes de indivíduos do Grupo 3, negativos para a infecção por HTLV, porém positivos para outras infecções virais (HIV e/ou HBV e/ou HCV).

3.3.4. Ensaio de reprodutibilidade entre diferentes analistas - Precisão intermediária

A precisão inter-ensaios da XqPCR HTLV para os alvos *pol* e *tax* foi avaliada por três analistas frente à reprodução do ensaio em plataforma automatizada. Cada analista reproduziu ensaios similares aos de curva padrão/LMD, com diluição de 10^6 a 10^0 e utilizou a mesma forma de interpretação de dados. A reprodução automatizada foi realizada na plataforma de diluições e pipetagem QIAgility® (QIAGEN), e as reações foram conduzidas nos aparelhos ABI 7.500 e/ou Roche LC480II, e os resultados obtidos apresentados como valores de ciclos de amplificação obtidos por cada analista.

3.3.5. Análise/expressão dos resultados da XqPCR HTLV

Análises dos resultados foram efetuadas pelos softwares das plataformas utilizadas, o 7.500 Systems Software Sequence Detection Software (SDS) versão 2.3 (Applied Biosystems) e LightCycler®480 SW versão 1.5 (Roche Diagnostics), levando em consideração a variação da fluorescência (ΔR_n) em relação ao número do ciclo de amplificação, sendo estatisticamente registrado o ciclo no qual foi emitida a maior intensidade de

fluorescência, excluídos os sinais inespecíficos ou de fundo/ruído (*baseline/background*). Portanto, a ΔR_n indicou a magnitude do sinal gerado, sendo o ciclo no qual este sinal foi computado, inversamente proporcional a quantidade de DNA presente na amostra.

Para as análises, a faixa entre os ciclos 1 e 15 foram empregadas na definição dos sinais de fundo/ruídos (*baseline/background*) e a linha limite (*threshold*) posicionada na fase exponencial, acima dos sinais inespecíficos e negativos. Nesta etapa da padronização os valores de C_q aceitos ficaram entre 1 e 44, desde que as curvas de amplificação e multicomponentes de fluorescência apresentassem características de uma reação conforme.

No sistema da Applied Biosystems (ABI) os resultados foram expressos na forma de Ct (*Cycle threshold*) e no da Roche Diagnostics (Roche) em Cp (*Crossing point*).

Por recomendação do The MIQE Guidelines, 2009 utilizou-se a denominação de C_q (ciclo de quantificação do sinal emitido pela fluorescência).

3.3.6. Marcas de reagentes de *Master Mix*

Devido a variedade de reagentes comerciais com diferentes formulações, neste estudo, foram avaliadas as seguintes marcas de *master mix*: TaqMan Master Mix Universal (Thermo Fisher-Applied Biosystems); JumpStart (Sigma-Aldrich); LightCycler Probes Master (Roche); Platinum®Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen); Kappa Probe Fast qPCR Kit *Master Mix* Universal (Kappa Biosystems); GoTaq®Probe qPCR Master Mix (Promega); PerfeCTa qPCR ToughMix (Quantabio); Fast Advanced Master Mix (BioRad); LuminoCt® qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich); QuantiTect Probe PCR Kits (Qiagen) e QuantiFast Probe PCR Kits (Qiagen).

Inicialmente foram avaliados os reagentes TaqMan Master Mix Universal (Thermo Fisher-Applied Biosystems) e JumpStart (Sigma-Aldrich)

frente a controles positivos da reação. Foi empregada a concentração final de *primers* e sondas a 200 nM para testar as sondas desenhadas para os alvos HTLV-2 e albumina marcadas com Cy5 e HEX, respectivamente, comparando-as com os resultados obtidos com as marcações anteriores (FAM).

Cabe salientar que a ordem de escolha da marcação das sondas Cy5 para o HTLV-2 e HEX para albumina, decorreu da possibilidade de cruzamento entre os fluoróforos FAM X HEX (*cross-talking*), devido a intersecção em algum ponto do comprimento de onda dessas químicas, na fase exponencial de leitura. Isto já foi observado em outros ensaios, necessitando compensação de cor no ato da análise, e muita experiência em qPCR, para melhor definir os resultados obtidos (Maria Gisele Gonçalves, comunicação pessoal). Como alguns equipamentos não dispõem desta ferramenta de compensação optou-se pela marcação HEX no gene de referência, visto que ele não está diretamente vinculado ao diagnóstico do HTLV, mas com a ressalva que se pretende avaliar tal combinação, no futuro.

Posteriormente, foram efetuadas as diluições e reações por gene alvo, no mesmo dia, comparando-se diferentes concentrações de plasmídeos frente a nove diferentes marcas de reagentes para o gene *pol* e sete marcas para o gene *tax*.

Para estabelecer uma análise comparativa entre as diferentes marcas de reagentes comerciais (independente do aumento no valor do Cq), no momento das análises foram instituídos alguns parâmetros para a garantia de no mínimo 90% de eficiência, conforme o equipamento utilizado, com valores próximos de $r^2 \geq 0.9$, *Slope* -3 e eficiência 2, ajustados pelo posicionamento da linha limítrofe (*threshold*), na região exponencial da curva de amplificação. Isto por conta das diferentes formulações apresentadas entre diferentes reagentes e não revelados na bula. Todavia, em ensaios qualitativos o posicionamento do *threshold* habitualmente limita-se a separar amplificações exponenciais (positivas) de ruídos (negativos), sendo referenciado pelos controles positivos da reação, para os quais se

estabelecem desvios aceitáveis de valores de Cq, sem o acompanhamento de curva padrão.

3.3.7. Otimização: inclusão de cloreto de magnésio (MgCl₂) na XqPCR HTLV

Na tentativa de melhorar o desempenho das reações de XqPCR HTLV, foi adicionado cloreto de magnésio (MgCl₂) a mistura da reação. Em ensaios *multiplex*, maiores quantidades de MgCl₂ na solução de amplificação podem ser necessários para assegurar a estabilidade da hibridação dos oligonucleotídeos e favorecer a sua hidrólise pela ação da *Taq* polimerase (Lorenz, 2012).

A maioria dos reagentes disponíveis comercialmente não informam a concentração de seus componentes, os reagentes para PCR em tempo real geralmente empregam 3,0 mM MgCl₂, sendo uma concentração ótima entre 3-6 mM (Real Time PCR Handbook-ABI- lifetechnologies.com/qpcr).

Desta forma, aleatoriamente, foi considerada uma concentração mínima de 3mM MgCl₂ presente nos reagentes, e foram adicionados volumes da solução de MgCl₂ a 25mM (Sigma-Aldrich), a fim de obter as concentrações finais entre 4mM a 6mM, na reação.

Foram empregadas em cada reação, como controles positivos os plasmídeos de HTLV-1, HTLV-2 e para o gene de referência, além da composição presente nos plasmídeos, foi realizado uma mistura (*pool*) de DNA obtido de material clínico humano, negativos para o HTLV, afim de verificar se as possíveis melhorias se estenderiam além do gene sintético.

Numa análise preliminar foram avaliadas *master mix* específicas para ensaios *multiplex*. Inicialmente, foram testadas as marcas Roche, Invitrogen e Kappa nas plataformas da LightCycler 480II (Roche) e 7.500 ABI (Applied Biosystems) com e sem adição complementar de MgCl₂.

3.4. Aplicação diagnóstica

A validação de um ensaio não está vinculada apenas aos resultados da sua padronização, para a aplicação diagnóstica se faz necessário confirmar de forma objetiva o seu desempenho em amostras clínicas, de acordo com critérios pré-estabelecidos (Rabenau et al., 2007).

Assim, após a padronização, os ensaios de XqPCR HTLV foram validados em amostras clínicas, conforme descrito a seguir.

3.4.1. Análise comparativa das qPCR HTLV nos formatos *single* e *multiplex*

Devido à ausência de um teste molecular de referência para o HTLV, foram comparados no presente estudo os formatos entre as qPCR HTLV desenvolvidas por Costa et al. (2011) e a XqPCR HTLV para o gene *pol*.

Nesta análise foram usadas 25 amostras de DNA provenientes de casos suspeitos de infecção por HTLV-1/-2, pertencentes ao Grupo 2, com volume suficiente para tal aplicação, evitando-se o esgotamento das mesmas.

3.4.2. Sensibilidade diagnóstica relativa XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) X WB

Esta análise foi realizada empregando-se amostras dos Grupos 1 e 2, e os resultados obtidos foram comparados com os do WB. Naqueles discrepantes foram observados os resultados de um segundo ensaio sorológico confirmatório, o imunoensaio de linha (LIA), ou molecular (PCR-RFLP *tax*), cujos resultados encontram-se publicados em Campos et al. (2017).

3.4.3. Precisão

Com o intuito de verificar o comportamento de diferentes “perfis” de resultados, amostras foram selecionadas, com base na média do valor do Cq apresentado, ou seja, com positividade alta, intermediária, baixa e escassa.

Uma vez que a quantidade de DNA é inversamente proporcional ao ciclo de amplificação no qual o alvo foi detectado (Higuchi et al., 1993; Real Time PCR Handbook, Life Technologies-ABI), ou seja, quanto maior a concentração de DNA menor o valor do Cq, a classificação da positividade foi arbitrariamente considerada por Cq em: < 30 [alta]; entre 31- 35 [média]; 36-37 [baixa] e ≥ 38 [escassa].

Para esta análise foram selecionadas 10 amostras do Grupo 2 com valores diferentes de ciclos de amplificação, que foram processadas em duplicatas, por 4 dias (desafios/replicadas), no intuito de avaliar a reprodução inter-ensaios dos resultados.

Com relação à precisão de reprodução dos resultados no mesmo ensaio/corrída (intra-corrída), foram analisadas 6 réplicas de 2 amostras.

Estas análises permitiram verificar a concordância de resultados numa mesma corrída (precisão intra-corrída), em dias diferentes (precisão intercorrídas), nos dois modelos de XqPCR HTLV propostos. Com base nesses dados, foram estimadas as frequências (%) com que estes valores de Cq são encontrados nas amostras da rotina.

3.5. Ensaio de quantificação da carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2

A CPV do HTLV pode ser empregada como um marcador de valor prognóstico, uma vez que a patogênese do HTLV-1 tem sido associada ao aumento de CPV, sendo útil no monitoramento do paciente (Tamegão-Lopes et al., 2006).

Com o escopo de verificar uma possível aplicação das XqPCR HTLV na determinação de CPV de HTLV-1/2 utilizando curva padrão previamente descrita, a quantificação foi inferida pela correlação dos Cq do gene alvo presente na amostra e os Cq dos genes contidos nos plasmídeos correspondentes. Ressaltando que, para a quantificação do gene de referência foram considerados apenas os valores obtidos com o plasmídeo HTLV-2/Albumina, pois foi o que apresentou melhor eficiência de amplificação, com maior extensão no comprimento de onda fluorescente, conforme ilustrado na **Figura 5**. No entanto, cumpre ressaltar que isto ocorreu apenas na composição do plasmídeo contendo o gene *pol* e albumina, e não nas amostras biológicas.

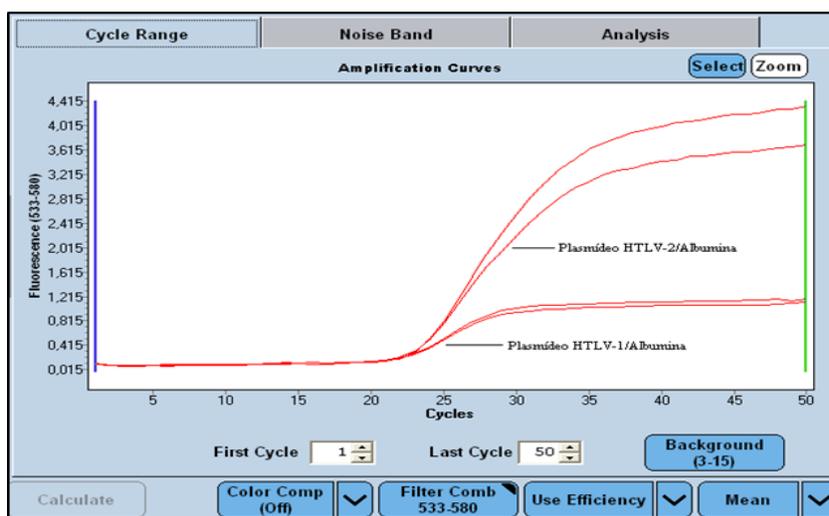


Figura 5. Curva de amplificação dos plasmídeos *tax1* e *tax2*.

Legenda: Curvas de amplificação dos plasmídeos: HTLV-1/Albumina e HTLV-2/Albumina (533-580 comprimento de onda do filtro HEX – sonda da Albumina). Plataforma Roche.

Para o cálculo de quantificação absoluta foi considerado que: partindo de 1×10^6 células/100 μ L, em 10 μ L haverá 1×10^5 e nos 5 μ L empregados na qPCR $0,5 \times 10^5$. Para o cálculo da quantificação, o número de cópias obtidos foi multiplicado por 2 para se obter o número de cópias do gene em 10^5 células.

Utilizando o método de quantificação acima descrito, foram avaliadas 16 amostras de DNA proviral, extraídas de CMN, para o gene alvo

pol, obtidas de pacientes em acompanhamento no CRT DST/aids-SP do Grupo 2. As amostras positivas para o HTLV-2, ou com resultados discrepantes foram repetidas na plataforma ABI.

Como descrito anteriormente, o LMQ deverá ser preciso quanto ao seu limite inferior de detecção. Cálculos estatísticos como a análise de regressão linear Probit, permitem inferir esse valor com IC 95%, e posto que, para o HTLV-2 o LMD ficou entre 100-10 cópias há que se considerar a necessidade de estimar o LMD/LMQ neste intervalo. Para tal, foi calculado o número de cópias pelo Probit, empregando-se os LMD replicados pelos analistas e realizadas diluições intermediárias entre os dois últimos pontos do LMD, com 16 réplicas para o HTLV-1 e 24 réplicas para o HTLV-2 e cálculos das médias LMD e LMQ.

3.6. Análise estatística

Para os cálculos de desvio padrão, coeficiente de variação, sensibilidade, especificidade e regressão linear Probit (Bliss e Fisher, 1935) foram utilizados a estatística analítica descritiva disponível na planilha Excel, do pacote e Microsoft Office Professional Plus 2016.

Para as análises comparativas entre os métodos foi utilizado o índice Kappa segundo Bland Altman (1991) e os cálculos de intervalo de confiança segundo Clopper e Pearson, 1934, disponíveis nas planilhas e orientações relacionadas no procedimento operacional padrão P-SG-0022- 004- Validação de métodos de ensaio de diagnóstico do IAL e seus respectivos anexos/máscaras. Os gráficos e cálculos de linearidade foram obtidos pelo teste de Grubbs com IC 99%

3.7. Análise de custos

No presente estudo, para o cálculo do custo das XqPCR HTLV foram contabilizados apenas os valores de cada insumo, aplicados desde a separação da amostra (plasma e PBL) até a finalização da amplificação, bem como dos testes sorológicos. Foram considerados os valores ofertados em pregões eletrônicos do ano de 2018. Avaliaram-se os custos dos ensaios isoladamente e, quando aplicados a diferentes algoritmos de testes confirmatórios de infecção por HTLV-1/2, em amostras de pacientes dos Grupos 1 e 2.

3.8. Conflito de Interesse

Declara-se não haver conflito de interesse com as empresas produtoras dos kits e reagentes empregados nesta pesquisa, bem como dos fabricantes das plataformas e equipamentos utilizados.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização e padronização de protocolo das reações XqPCR HTLV

Os quadros a seguir apresentam as sequências de *primers* e sondas e os protocolos de reação otimizados das XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) de HTLV-1/-2.

O **Quadro 3** mostra as alterações realizadas nas sequências dos oligonucleotídeos, que compõem as sondas, bem como as diferentes marcações químicas necessárias para constituir o *multiplex*, ressaltando a inclusão de uma base degenerada (R) para a sonda HTLV-2_*pol*, que permite o reconhecimento das bases A ou G no DNA molde.

Quadro 3. Sequência e marcação dos oligonucleotídeos empregados na XqPCR HTLV_*pol*.

PCR em tempo real (qPCR)			
Genes	Primers / Sondas	Sequência 5' - 3'	Referência / Posição no gene
<i>pol</i>	HTLV-1 F	GAACGCTCTAATGGCATTCTTAAAACC	Adaptado de : Tamegão-Lopes et al; 2006/ Costa et al; 2011 4788 - 4895
	HTLV-1 R	GTGGTTGATTGTCCATAGGGCTAT	
	HTLV-1 Pb*	FAM-ACTTTACTGACAACCCGACCTACCCATGG-BHQ-1	
	HTLV-2 F	CAACCCACCAGCTCAGG	Adaptado de : Tamegão-Lopes et al; 2006/ Costa et al; 2011 4740 - 4830
	HTLV-2 R	GGGAAGGTTAGGACAGTCTAGTAGATA	
	HTLV-2 Pb*	CY5- TGGTCGAGAGAACCAATGGT <u>R</u> AATCAAAA-BHQ-2	
GR	Albumina F	GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA	Adaptado de: Dehée et al; 2002/ Costa et al; 2011 16222 - 16351
	Albumina R	GGGCATGACAGGTTTTGCAATATTA	
	Albumina-Pb*	HEX-TCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTCTAGGC-BHQ1	

Legenda: GR: Gene de Referência; F: primer senso; R: primer antissenso; Pb*: sondas com sequências e/ou marcações modificadas do original: Sonda R: base A ou G; HEX: fluoróforo 6-cloro; BHQ: *black hole quencher*. FAM: fluoróforo 6-carboxi; CY5: fluoróforo; cianina.

O **Quadro 4** apresenta os valores/volumes de cada componente da mistura da reação de qPCR, e as alterações no volume da água, devido a inclusão ou não do ROX à mistura. Esses valores foram obtidos empregando-se a fórmula de diluição de misturas proporcionais.

Quadro 4. Protocolo de reação da XqPCR HTLV_*pol* (volumes e concentrações) empregado nas plataformas ABI e Roche.

X-qPCR HTLV - pol			
Alvo	HTLV-1	HTLV-2	Albumina
Marcação da sonda	FAM	CY5	HEX
Reagentes	Reação 1X		
Master mix	12,5µL		
Água	ABI 3,5µL		Roche 3,9µL
*ROX	0,4µL		0
Iniciador F	0,4µL [12,5µM] (208nM final)	0,4µL [12,5µM] (208nM final)	0,4µL [12,5µM] (208nM final)
Iniciador R	0,4µL [12,5µM] (208nM final)	0,4µL [12,5µM] (208nM final)	0,4µL [12,5µM] (208nM final)
Sonda	0,4µL [12,5µM] (208nM final)	0,4µL [12,5µM] (208nM final)	0,4µL [12,5µM] (208nM final)
Total da mistura	20µL		
DNA alvo	5µL		
Volume final	25µL		

Legenda: *ROX (Referência passiva-Applied Biosystems (ABI)).

O **Quadro 5** exibe as alterações realizadas nas marcações e/ou sequência das sondas fluorescentes, para constituir a XqPCR HTLV_*tax*, salientando- se que para a sonda do GR, as marcações/alterações ilustradas podem ser empregadas, independente dos demais componentes do *multiplex*, ou seja, com ou sem o *quencher* interno, BHQ ou IABFQ.

Quadro 5. Sequência e marcação dos oligonucleotídeos empregados na XqPCR HTLV_*tax*.

PCR em tempo real (qPCR)			
Genes	Primers / Sondas	Sequência 5' - 3'	Referência / Posição no gene
tax	HTLV-1 F	CGGATACCCAGTCTACGTGTT	Adaptado de: Takenouchi et al; 2011/ 7359 - 7458
	HTLV-1 R	ATGTAGCAGTGCGGGATGAC	
	HTLV-1 Pb*	FAM-CTGTGTACAAGGCCACTGGTGCC-BHQ1	
	HTLV-2 F	CGATTGTGTACAGGCCGATTG	Adaptado de: Waters et al; 2011/ 7272 - 7347
	HTLV-2 R	GATGTAGCTGTACGGGAGGAC	
	HTLV-2 Pb*	Cy5-TGTCCCGTCTCAGGTGGTCTATGTTCCA-BHQ2	
GR	Albumina F	GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA	Adaptado de: Dehée et al; 2002/ 16222-16351
	Albumina R	GGGCATGACAGGTTTTGCAATATTA	
	Albumina- Pb*	HEX-TCTCTTGTG/ZEN/GGCTGTAATCATCGTCTAGGC-IABFQ	

Legenda: GR: Gene de Referência; F: primer senso; R: primer antissenso; Pb: sonda; FAM: fluoróforo 6-carboxi; CY5: fluoróforo Cianina; R: base A ou G; ; HEX: fluoróforo 6-cloro; BHQ: black hole *quencher*; ZEN: *quencher* interno; IABFQ: Iowa *Black quencher* .

O **Quadro 6** mostra os valores/volumes de cada componente da mistura da reação XqPCR HTLV_*tax*, e as alterações no volume da água,

devido a inclusão ou não do ROX à mistura, dependente da plataforma a ser empregada. Salientando que a presença de ROX na *master mix*, não inviabiliza seu emprego em outras plataformas. Sua restrição se atém apenas em caso de escolha deste fluoróforo para marcar um gene alvo, o que não ocorreu neste estudo. Esses valores foram obtidos empregando-se a fórmula de diluição de misturas proporcionais

Quadro 6. Protocolo de reação da XqPCR HTLV_*tax* (volumes e concentrações) empregado nas plataformas ABI e Roche.

X-qPCR HTLV - tax			
Alvo	HTLV-1	HTLV-2	Albumina
Marcação da sonda	FAM	CY5	HEX
Reagentes	Reação 1X		
Master mix	12,5µL		
Água	ABI 1,1µL		Roche 1,5µL
*ROX	0,4µL		0
Iniciador F	0,5µL [10µM] (200nM final)	0,5µL [10µM] (200nM final)	0,5µL [10µM] (200nM final)
Iniciador R	0,5µL [10µM] (200nM final)	0,5µL [10µM] (200nM final)	0,5µL [10µM] (200nM final)
Sonda	1µL [2,5µM] (100nM final)	1µL [2,5µM] (100nM final)	1µL [2,5µM] (100nM final)
Total da mistura	20µL		
DNA alvo	5µL		
Volume final	25µL		

Legenda: *ROX (Referência passiva-Applied Biosystems (ABI)).

4.1.1. Determinação da concentração de plasmídeos para serem usados como controles positivos de reação

As concentrações dos plasmídeos escolhidas para controles positivos ficaram entre 10^4 e 10^3 , por apresentarem nos alvos principais (HTLV-1 e HTLV-2), ciclos de amplificação ≤ 36 com as diferentes marcas de reagentes testados (item 4.7). Para o gene *pol* os Cq variaram entre 27 a 33 (HTLV-1) e 31 a 36 (HTLV-2); e para o gene *tax* entre 24 a 30 para os dois alvos (HTLV-1/-2). Abaixo de 10^2 cópias eventuais falhas na amplificação do

gene de referência foram observadas quando da composição com o HTLV-1 nos plasmídeos, principalmente para o gene *pol*.

4.2. Linearidade

As figuras a seguir mostram que há correlação entre as diferentes concentrações e a capacidade de detecção do DNA, entre os formatos *single* e *multiplex* para os genes *pol* e *tax*, sem interferência das cinéticas das químicas presentes no ensaio de múltiplos alvos, e mostram uma relação quase que perfeita entre elas, ou seja, a mesma sensibilidade analítica nos dois formatos. Ademais, mostram valores de Cq menores quando pesquisado o gene *tax*, tanto no formato *single* como *multiplex*.

A **Figura 6** mostra que a capacidade de detecção do alvo (plasmídeo contendo o gene *pol*) é proporcional a concentração do analito nos dois formatos de ensaio (*single* e *multiplex*), ou seja, ambos apresentaram a capacidade de detecção entre 10 e 1 cópia para o alvo *pol* – HTLV-1, ilustrada nas diluições entre 10^6 - 1cópia/5 μ L, pontos 1-7, respectivamente.

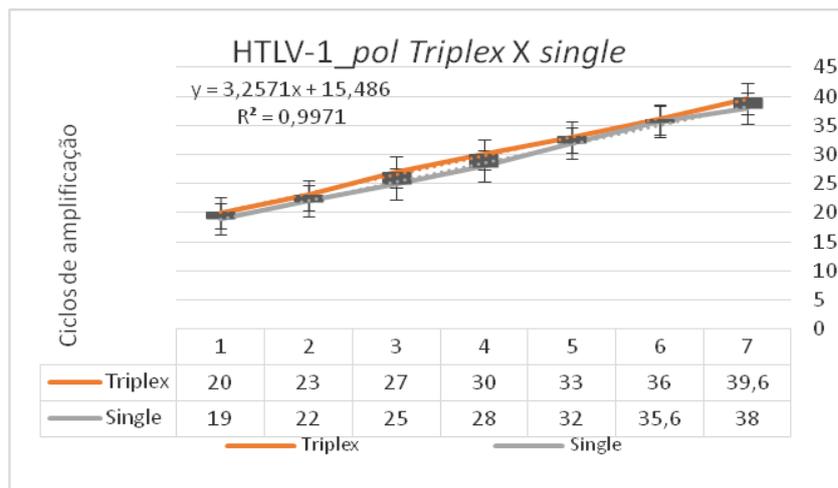


Figura 6. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos *single* e *multiplex* para a detecção do HTLV-1 (*pol*).

A **Figura 7** mostra que há correlação entre os LMDs nos seis pontos da diluição seriada (10^6 - 10 cópias/ $5\mu\text{L}$), entre os dois formatos de ensaio (*single* e *multiplex*), ou seja, ambos apresentaram capacidade de detecção entre 100 e 10 cópias para o alvo *pol* – HTLV-2.

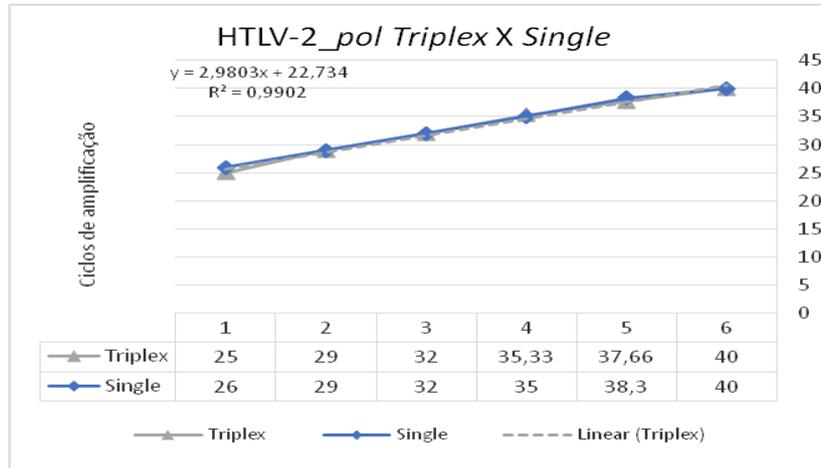


Figura 7. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos *single* e *multiplex* para a detecção do HTLV-2 (*pol*).

Os LMDs apresentados nas **Figuras 8 e 9** mostram perfeita correlação entre os dois formatos de ensaio (*single* e *multiplex*), nas diferentes concentrações, (10^6 - 10 cópias/ $5\mu\text{L}$) do alvo HTLV-1-*tax* e HTLV-2-*tax*, respectivamente.

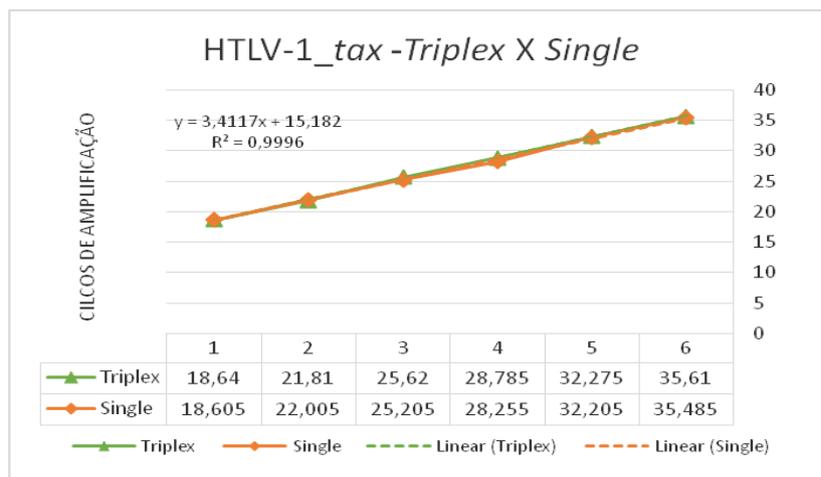


Figura 8. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos *single* e *multiplex* para a detecção do HTLV-1 (*tax*).

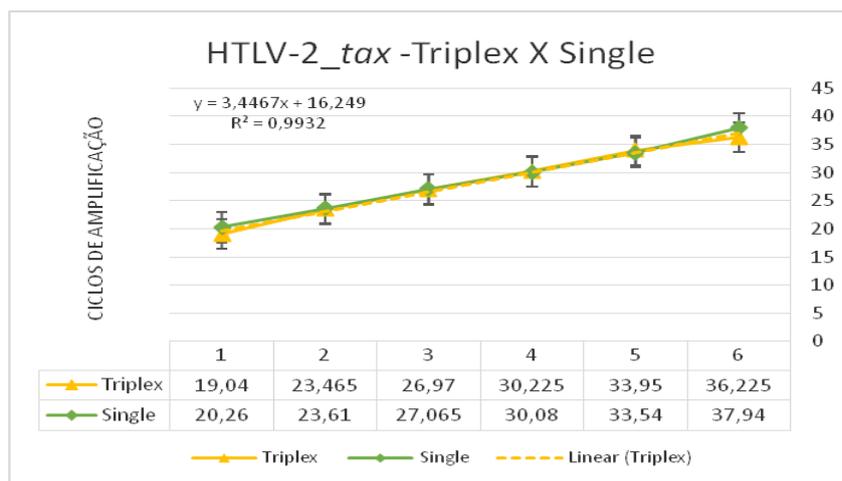


Figura 9. Curva de regressão linear comparando os ensaios de qPCR HTLV nos formatos *single* e *multiplex* para a detecção do HTLV-2 (*tax*).

4.3. Sensibilidade Analítica - Limite Mínimo de Detecção (LMD)/Eficiência

As figuras a seguir apresentam as curvas de LMD/Eficiência que foram obtidas nas plataformas ABI e Roche, com os respectivos valores de número de cópias/5 μ L e cálculo de eficiência para cada gene alvo pesquisado, ressaltando maior dificuldade na detecção de HTLV-2 em relação ao HTLV-1, tanto para o gene *pol* como para *tax*. Relembrando que os valores desejados para esta análise estabelecem os parâmetros de curva de inclinação da reta (*slope*) entre -3,1 a -3,6, R^2 próximo a 1, para que possam ser empregados em uma técnica espectrofotométrica, com alta eficiência, resultando em eficiências entre 90-110% e 80-120%, desejáveis para ensaios *single* e *multiplex*, respectivamente.

4.3.1. Curva padrão/LMD para o HTLV-1, com o alvo gene *pol*

O LMD do gene sintético apresentando positividade para o HTLV-1_*pol* ficou entre 10 e 1 cópia/5 μ L, com valores de *Slope* de -3,32 e -3,29 e

coeficiente de regressão linear (R) próximos a 1, resultando em eficiências de 100% e 101,4% nas plataformas ABI (A) e ROCHE (B), respectivamente, conforme apresentado na **Figura 10**.

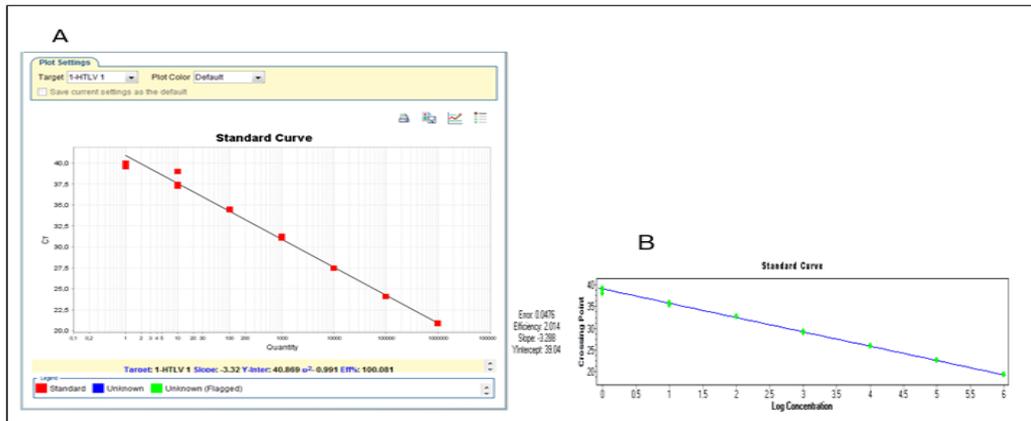


Figura 10. Curva Padrão LMD HTLV-1_*pol* (ABI e ROCHE).

Legenda: Standard Curve (Curva padrão) mostrando a correlação entre quantidade de analito e ciclos de quantificação (Cq), a direita (A) na plataforma ABI e a esquerda em (B) na plataforma Roche.

4.3.2. Curva padrão/LMD para o HTLV-2, com o gene *pol*

O LMD do gene sintético apresentando positividade para o HTLV-2_*pol* ficou entre 100 e 10 cópias/5 μ L, com valores de *Slope* de -3,33 e -3,19 e coeficiente de regressão linear (R) próximos a 1, e eficiências calculadas de 99,3% e 104% nas plataformas ABI (A) e Roche(B), respectivamente, conforme mostra a **Figura 11**.

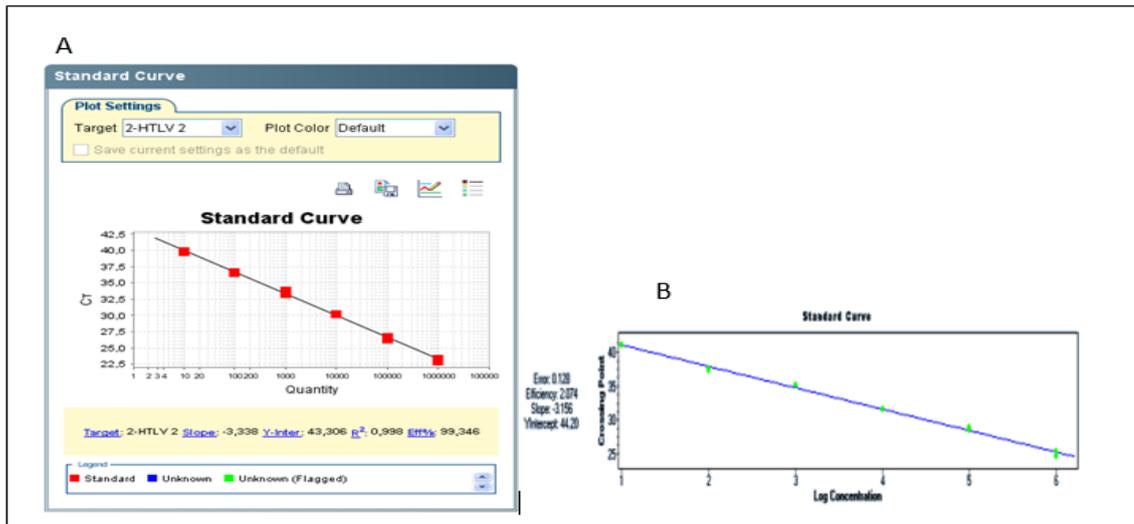


Figura 11. Curva padrão LMD HTLV-2_*pol* (ABI e ROCHE).

Legenda: Standard Curve (Curva padrão) mostrando a correlação entre quantidade de analito e ciclos de quantificação (Cq), a direita (A) na plataforma ABI e a esquerda em (B) na plataforma Roche.

4.3.3. Curva padrão/LMD para o HTLV-1 com o gene *tax*

A maior diluição do gene sintético apresentando positividade para o HTLV-1_*tax* foi de 1 cópia/5µL, com valores de *Slope* de -3,30 e -3,31 e coeficiente de regressão linear (R) próximos a 1, resultando em eficiências de 110,6% e 100,2% plataformas ABI (A) e ROCHE (B), respectivamente, conforme apresentado na **Figura 12**.

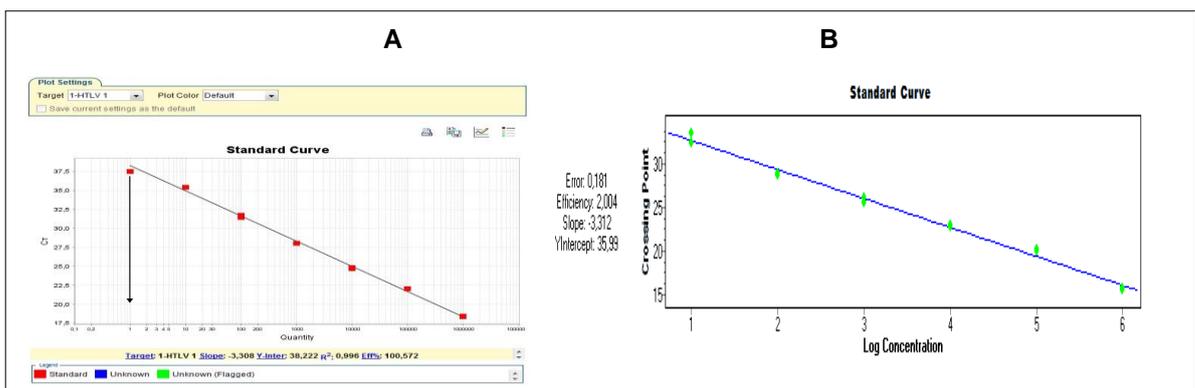


Figura 12. Curva padrão LMD HTLV-1_*tax* (ABI e ROCHE).

Legenda: Standard Curve (Curva padrão) mostrando a correlação entre quantidade de analito e ciclos de quantificação (Cq), a direita (A) na plataforma ABI e a esquerda em (B) na plataforma Roche.

4.3.4. Curva padrão/LMD para HTLV-2 com o gene *tax*

A maior diluição do gene sintético apresentando positividade para o HTLV-2_ *tax* foi de 10 cópias/5µL, com valores de *Slope* de -3,41 e -3,31 e coeficiente de regressão linear (R) 1, com eficiência calculada de 96,2% e 100,2% nas plataformas ABI (A) e ROCHE (B), respectivamente, conforme apresentado na **Figura 13**.

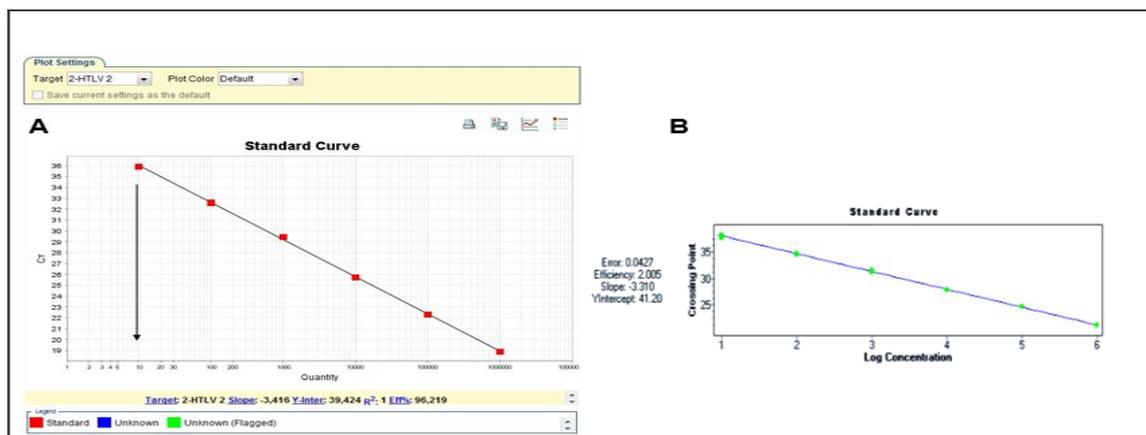


Figura 13. Curva padrão LMD HTLV-2_ *tax* (ABI e ROCHE).

Legenda: Standard Curve (Curva padrão) mostrando a correlação entre quantidade de analito e ciclos de quantificação (Cq), a direita (A) na plataforma ABI e a esquerda em (B) na plataforma Roche.

4.4. Estabilidade da curva padrão

A estabilidade das diluições/concentrações dos plasmídeos empregados na confecção da curva padrão após cinco desafios de congelamento e descongelamento mostraram que o plasmídeo HTLV-1-*pol* manteve uma boa estabilidade até 10 cópias com variação entre 0,1 a 0,5, já para o HTLV-2-*pol* a estabilidade manteve-se até 10^4 cópias, com variação entre 0,1 a 0,5 e instabilidade a partir de 10^3 cópias. Os plasmídeos com as sequências do gene *tax* apresentaram boa estabilidade até a diluição de 10 cópias para o HTLV-1 e HTLV-2 (**Tabela 1**).

Tabela 1. Avaliação da estabilidade das concentrações dos genes sintéticos *pol* e *tax* empregados na detecção e identificação de HTLV-1 e HTLV-2, após cinco ciclos de congelamento e descongelamento.

Gene alvo	Ciclos de quantificação X quantidades de descongelamentos																		
	HTLV-1									HTLV-2									
	Cópias/ 5µL	1	2	3	4	5	Média	Desvio padrão	*Variação	IC 95%	1	2	3	4	5	Média	Desvio padrão	*Variação	IC 95%
<i>pol</i>	1000000	19	20	21	21	21	20	0,7	0,1	0,4	23	24	24	24	24	24	0	0,1	0,2
	1000000	21	20	21	21	21	21	0,4	0,5		24	24	24	24	25	24	0	0,1	
	100000	23	23	25	24	24	24	0,7	0,3		26	28	27	28	27	27	1	0,5	
	100000	23	24	25	24	24	24	0,6	0,5		27	28	28	28	29	28	1	0,3	
	10000	26	27	28	27	28	27	0,7	0,5		30	31	31	31	31	31	0	0,1	
	10000	26	27	28	28	28	27	0,7	0,5		30	31	31	31	32	31	1	0,3	
	1000	29	30	31	31	31	30	0,7	0,2		34	35	35	35	35	35	0	0,1	
	1000	30	30	31	31	31	31	0,4	0,3		34	35	35	0	35	35	13	0,1	
	100	33	34	34	34	35	34	0,6	0,4		37	38	37	38	38	38	0	0,2	
	100	33	33	34	34	35	34	0,7	0,5		37	38*	0	0	0	38	18	0,1	
	10	36	36	37	37	38	37	0,7	0,2		40	0	0	0	0	40	19	0,0	
	10	37	37	37	38	38	37	0,4	0,2		40	0	0	40	0	40	20	0,0	
	1	0	0	39	39	0	39	19,5	0,0		0	0	0	0	0	0	0	0,0	
1	39	0	0	0	0	39	0,0	0,0		0	0	0	0	0	0	0	0,0		
<i>tax</i>	1000000	18	18	18	18	18	18	0,1	0,0	0,1	20	19	19	19	19	19	0,2	0,1	0,1
	1000000	18	18	18	18	18	18	0,1	0,0		19	19	19	18	19	19	0,5	0,2	
	100000	22	22	21	22	22	22	0,4	0,2		22	22	22	22	23	22	0,4	0,1	
	100000	22	22	21	22	22	21	0,3	0,1		23	21	22	22	23	22	0,8	0,7	
	10000	25	26	25	25	25	25	0,3	0,1		26	25	26	25	26	26	0,6	0,3	
	10000	25	25	25	25	25	25	0,2	0,0		26	26	25	25	27	26	0,5	0,2	
	1000	28	29	29	28	28	28	0,3	0,1		29	29	29	29	30	29	0,4	0,4	
	1000	28	28	27	27	29	28	0,4	0,2		29	29	29	29	30	29	0,2	0,6	
	100	31	32	32	31	31	31	0,4	0,3		33	33	33	33	33	33	0,3	0,1	
	100	32	32	32	32	31	32	0,2	0,1		33	33	32	32	31	32	0,6	0,3	
	10	35	34	34	36	35	35	0,8	0,5		36	36	36	36	36	36	0,2	0,1	
	10	35	35	35	35	35	35	0,2	0,0		35	36	38	36	37	36	0,9	0,9	
	1	38	38	0	0	0	38	18,6	0,0		38	0	0	0	0	38	18,1	0,0	
1	39	0	0	40	39	39	19,2	0,1		0	0	0	0	0	0	0,0	0,0		

Legenda: QIAgility: plataforma automatizada de diluições e pipetagem; * Variação calculada entre valores diferentes de zero

4.5. Especificidade

Os ensaios de XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) mostraram 100% de especificidade analítica, com resultados negativos para o HTLV-1, HTLV-2 e positividade para o gene de referência nas 30 amostras do Grupo 3, mostrando não haver interferência do HIV e/ou HBV e/ou HCV no diagnóstico molecular de HTLV.

4.6. Reprodutibilidade

Os resultados dos ensaios de XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) realizado por três profissionais selecionados, mostraram consistência na reprodução dos ensaios *multiplex* para a detecção dos alvos HTLV-1 e HTLV-2, dentro da faixa do LMD esperado (**Tabela 2**). As variações calculadas apresentaram em sua maioria resultados inferiores a 1, indicando uma boa reprodução dos ensaios, exceto para amostras onde havia escassez do analito, o que é esperado para este tipo de ensaio e explicado pela distribuição de Poisson.

Tabela 2. Avaliação da reprodutibilidade/robustez do ensaio XqPCR HTLV empregando-se os genes *pol* e *tax* para a detecção e identificação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2.

Gene alvo	Ciclos de quantificação										
	HTLV-1						HTLV-2				
	Cópias/ 5 μ L	QIAgility	Analista 1	Analista 2	Analista 3	*Variação	QIAgility	Analista 1	Analista 2	Analista 3	*Variação
<i>pol</i>	1000000	20/20	20/20	21/21	21/21	0,3	23/23	23/23	24/24	25/25	0,7
	100000	23/24	24/24	25/25	24/24	0,4	27/27	26/27	27/27	29/28	0,7
	10000	27/27	27/27	28/28	27/27	0,2	30/30	30/30	31/31	32/32	0,7
	1000	30/30	30/30	31/31	31/31	0,3	34/34	33/33	34/35	35/35	0,6
	100	34/33	34/34	35/35	34/34	0,4	37/37	36/37	37/38	37/38	0,4
	10	38/36	37/38	38/38	38/37	0,5	40/40	0/39	38/39	39/38	0,6
	1	0/37	0/39	0/0	38/0	0,7	0/0	0/0	0/0	0/0	0,0
<i>tax</i>	1000000	18/18	18/19	17/18	18/19	0,4	19/20	20/21	20/19	20/19	0,4
	100000	22/22	22/22	21/20	22/21	0,5	23/23	23/23	23/22	22/23	0,2
	10000	25/25	26/26	24/24	25/25	0,5	26/26	25/26	27/25	26/26	0,4
	1000	28/28	29/29	27/28	28/28	0,4	30/30	29/29	30/29	28/29	0,4
	100	31/31	32/32	30/31	30/31	0,5	33/33	31/31	33/33	33/33	0,8
	10	35/35	36/36	34/35	34/35	0,5	36/36	34/35	36/36	36/35	0,5
	1	38/39	0/0	45/0	38/37	8,2	39/38	0/39	0/0	38/0	0,3

Legenda: QIAgility: plataforma automatizada de diluições e pipetagem; * Variação calculada entre valores diferentes de zero

4.7. Avaliação de reagentes comerciais (*Master mix*)

As figuras a seguir mostram os resultados da utilização de *master mix* universal, disponível comercialmente (*master mix* TaqMan Universal PCR Master Mix- ABI), quando aplicado em ensaio de qPCR no formato *single* e *multiplex*, frente a controles positivos de HTLV-1, HTLV-2 e gene de

referência (**Figura 14**), e os resultados de nove marcas de *master mix* específicos para ensaios *multiplex* usados na XqPCR HTLV_*pol* e sete marcas usadas na XqPCR HTLV_*tax* (**Figuras 15-16 e 17-18**, respectivamente).

Resumidamente, as curvas de amplificação obtidas empregando-se a solução *master mix* universal, só apresentaram forma sigmoideal, quando esta *master mix* foi aplicada ao ensaio no formato *single* (A-C) para os três alvos pesquisados, e para a detecção de HTLV-1 no *multiplex* (D). Ao contrário, esse reagente não mostrou boa eficácia quando usado na qPCR no formato *multiplex* (E-F), cujas curvas são típicas de reações não otimizadas/padronizadas (**Figura 14**).

Já o desempenho dos *master mix* específicos de ensaios *multiplex* quando utilizados em diferentes concentrações de plasmídeos, entre 10^6 e 1 cópia/5 μ L, simulando diferentes concentrações presentes em amostras biológicas, mostraram que qualquer um deles poderá ser usado de acordo com os valores de eficiência apresentados.

Os reagentes estão ilustrados por cor, constando no interior de cada bloco o número correspondente ao ciclo de amplificação no qual o DNA alvo foi detectado/amplificado (**Figuras 15 a 18**).

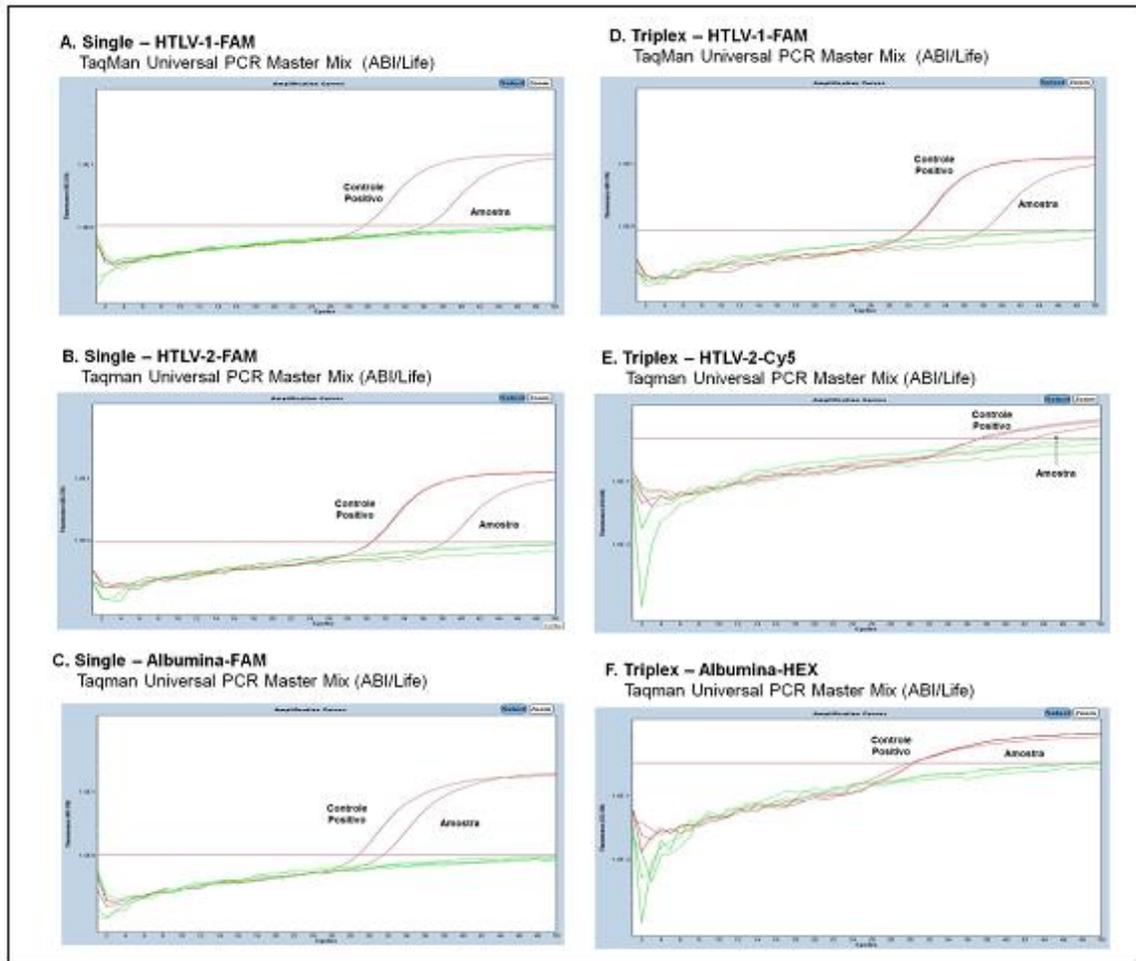


Figura 14. Curvas de amplificação obtidas nas reações de qPCR nos formatos *single* e *multiplex* - *master mix* TaqMan Universal PCR Master Mix-ABI.

Legenda: *Amplification plot/curves*: Curvas de amplificação; *Single*: ensaio cotendo um único alvo para detecção de A-C; e *Triplex/multiplex*: ensaio contendo mais de um alvo de D-F, para os alvos HTLV-1, HTLV-2 e GR (Albumina).



Figura 15. Avaliação de nove marcas de *master mix* comerciais na XqPCR HTLV_*pol1*.

Legenda: Valores de Cqs obtidos frente a diferentes concentrações do gene sintético, contendo as sequências da Albumina e *pol* de HTLV-1 em nove marcas variadas de reagentes comerciais.

Os valores de eficiência apresentados de acordo com o reagente empregado foram: 101,2% (ROCHE), 100,35% (Invitrogen), 98,2% (Promega), 100,35% (Quanta), 100,45% (BioRad), 100,45% (Kappa), 100,35% (Sigma); 100,1% (Qiagen-Probe Master) e 100% (Qiagen-Quanti Fast) para o gene *pol* de HTLV-1. Enquanto para o gene da Albumina foram: 111,7% (ROCHE), 106,7% (Invitrogen), 108,1% (Promega), 100,35% (Quanta), 95,9% (BioRad), 107,4% (Kappa), 109,6% (Sigma); 99,9% (Qiagen-Probe Master) e 113% (Qiagen-Quanti Fast).

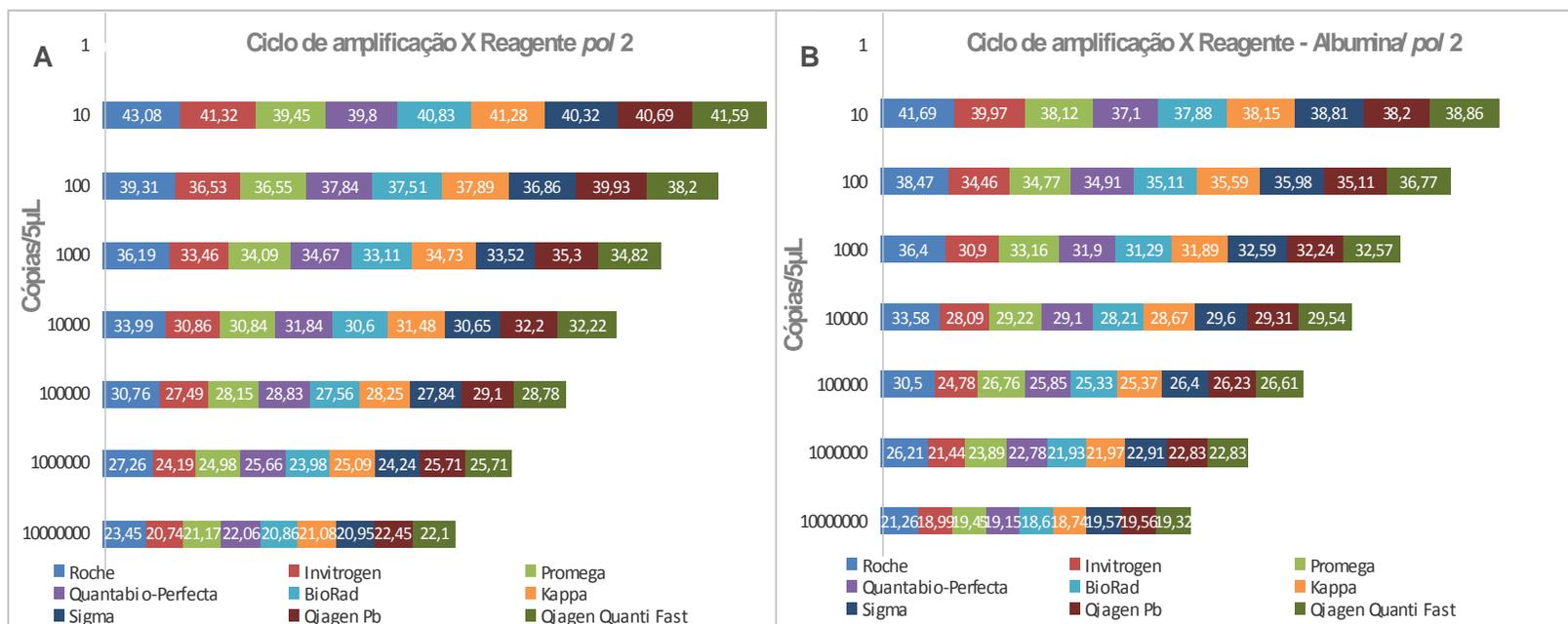


Figura 16. Avaliação de nove marcas de *master mix* comerciais na XqPCR HTLV_*pol2*.

Legenda: Valores de Cqs obtidos frente a diferentes concentrações do gene sintético contendo as sequências da Albumina e *pol* e HTLV-2 em nove marcas variadas de reagentes comerciais.

Os valores de eficiência calculados, ficaram dentro da faixa preconizada para ensaios no formato multiplex (entre 80-120%), foram: 100,45% (ROCHE), 100,45% (Invitrogen), 107,8% (Promega), 100,25% (Quanta), 100,35% (BioRad), 100,25% (Kappa), 102% (Sigma); 100,25% (Qiagen-Probe Master) e 102,75% (Qiagen-Quanti Fast) para o gene *pol* de HTLV-2. Enquanto para o gene da Albumina foram: 97,8% (ROCHE), 100,1% (Invitrogen), 103,4% (Promega), 108% (Quanta), 100,5% (BioRad), 100,1% (Kappa), 102,5% (Sigma); 105,5% (Qiagen-Probe Master) e 102,5% (Qiagen-Quanti Fast).

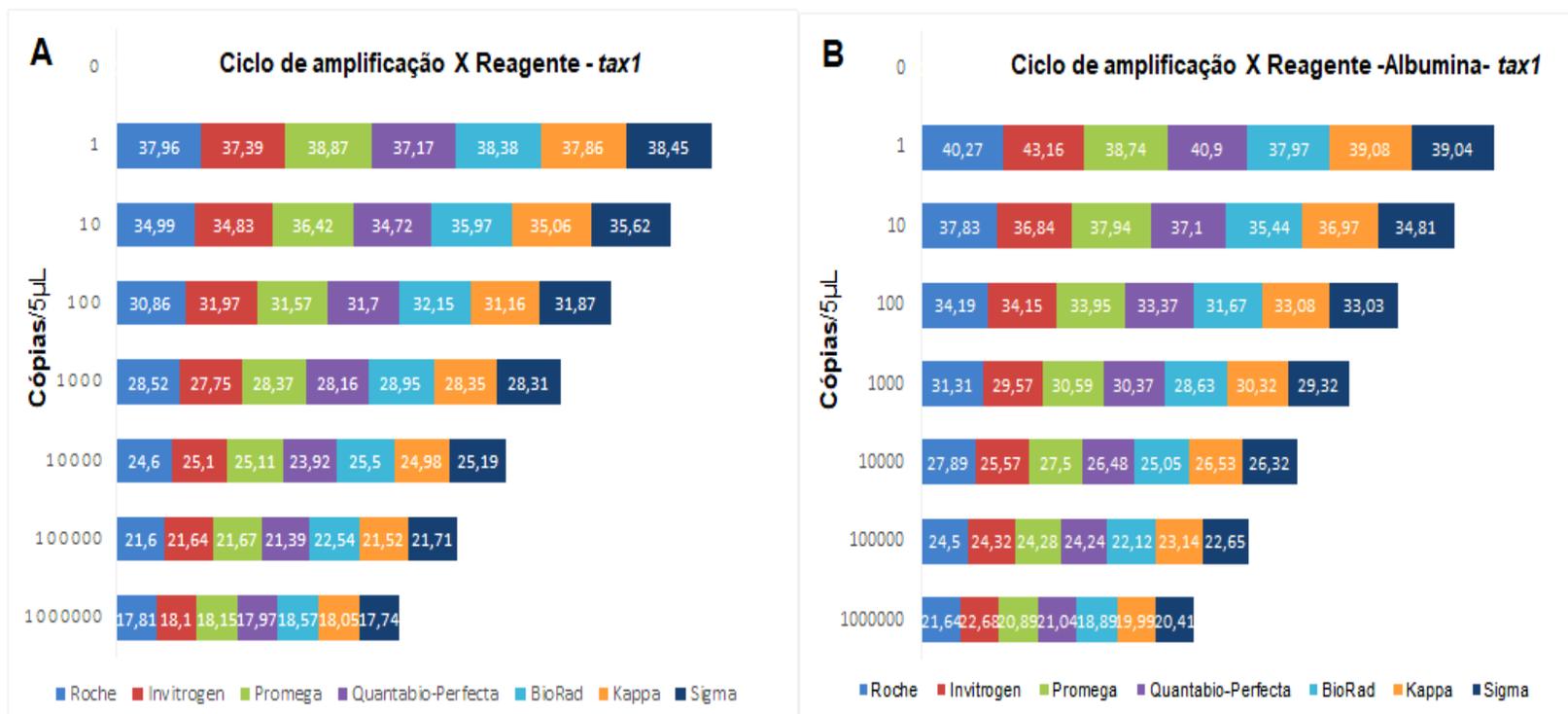


Figura 17. Avaliação de sete marcas de *master mix* comerciais na XqPCR HTLV_ *tax1*.

Legenda: Valores de Cqs obtidos frente a diferentes concentrações do gene sintético com as sequências de Albumina e *tax* de HTLV-1 em sete marcas variadas de reagentes comerciais.

Os valores de eficiência calculados para o gene *tax* de HTLV-1 foram: 108,98% (ROCHE), 102,9% (Invitrogen), 105,15% (Promega), 101,8% (Quanta), 100,10% (BioRad), 102,06% (Kappa) e 105,9% (Sigma). Enquanto para o gene da Albumina foram: 94,2% (ROCHE), 102,6% (Invitrogen), 106,8% (Promega), 99,6% (Quanta), 102,3% (BioRad), 107,6% (Kappa) e 107,8% (Sigma).

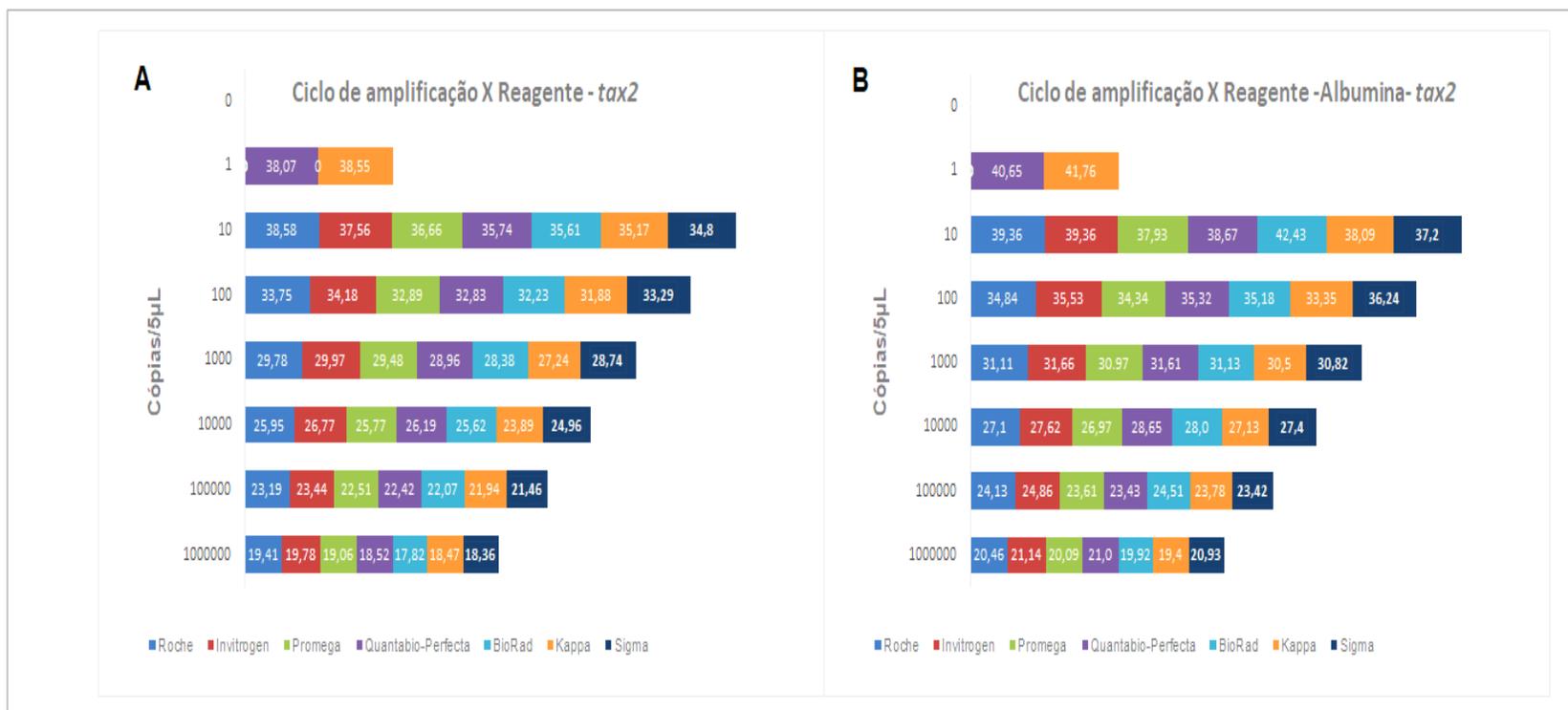


Figura 18. Avaliação de sete marcas de *master mix* comerciais na XqPCR HTLV_ *tax2*.

Legenda: Valores de Cqs obtidos frente a diferentes concentrações do gene sintético com as sequências de Albumina e *tax* de HTLV-2 em sete marcas variadas de reagentes comerciais.

Os valores de eficiência calculados foram: 94,6% (ROCHE), 91,244% (Invitrogen), 94,6% (Promega), 101,6% (Quanta), 93,37% (BioRad), 96,37% (Kappa) e 94,17% (Sigma) para o gene *tax* de HTLV-2. Enquanto para o gene da Albumina foram: 99,4% (ROCHE), 93,9% (Invitrogen), 94,8% (Promega), 93,2% (Quanta), 94,9% (BioRad), 94,2% (Kappa).

4.8. Otimização com Cloreto de Magnésio

Os **Quadros 7 e 8 e Figura 19**, mostram que não houve melhora considerável de resultados após a inclusão de concentração adicional de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) à reação usando três marcas de reagentes. Os ciclos de amplificação/detecção foram praticamente idênticos, exceto para o gene da albumina e na concentração final de 5 mM, não justificando assim sua inclusão no protocolo, visto que este alvo é empregado apenas para assegurar um efetivo processo de extração do DNA da amostra biológica.

Quadro 7. Valores de C_q (*Cycle quantification*) obtidos pelos controles positivos nas reações de XqPCR HTLV empregando-se diferentes marcas de *master mix* sem e com adição complementar de magnésio, na concentração final de 5mM, na plataforma da Roche LightCycler 480II.

	Roche	Roche + $MgCl_2$	Invitrogen	Invitrogen + $MgCl_2$	Kappa	Kappa + $MgCl_2$
HTLV-1	24/24	24/24	25/25	24/25	24/24	24/24
HTLV-2	35/35	35/35	35/33	33/33	33/33	32/32
Albumina	34/35	32/33	33/33	31/32	32/32	31/31

Quadro 8. Valores de C_q (*Cycle quantification*) (em duplicata) obtidos nas reações de XqPCR HTLV empregando-se diferentes marcas de *master mix* sem e com adição complementar de magnésio na plataforma ABI 7.500.

	Roche	Roche + $MgCl_2$	Invitrogen	Invitrogen + $MgCl_2$	Kappa	Kappa + $MgCl_2$
HTLV-1	21/21	21/21	22/22	21/22	20/20	20/20
HTLV-2	33/33	33/33	32/32	32/32	31/30	30/30
Albumina	34/33	32/32	33/33	31/31	31/31	29/29

A **Figura 19** mostra que em 4, 5 e 6, há melhora no comprimento/extensão das curvas de amplificação do gene de referência frente às três marcas de *master mix* utilizadas em relação às curvas apresentadas em 1, 2 e 3, porém com pouca alteração no ciclo de detecção/amplificação.

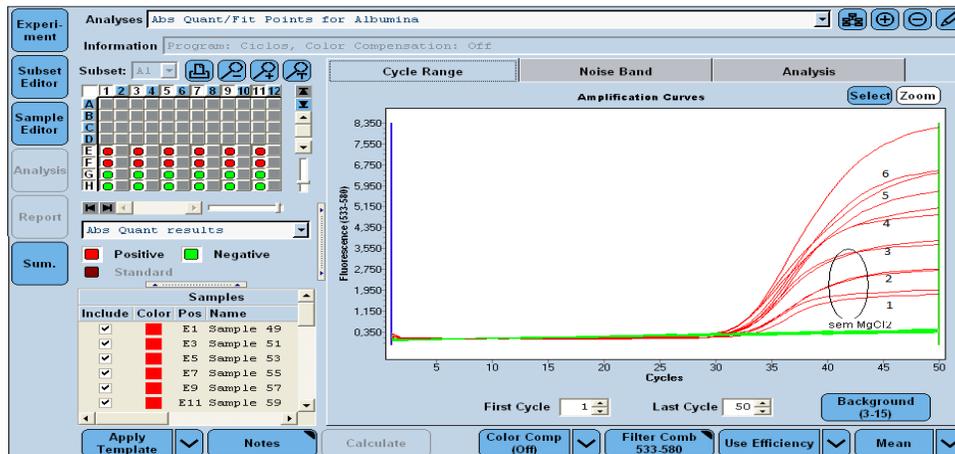


Figura 19. Curvas de amplificação para análise de variação na intensidade de fluorescência, com e sem $MgCl_2$,

Legenda: Curvas de amplificação do gene de referência (albumina) com diferentes reagentes: 1 - Reagente Roche sem a adição de $MgCl_2$, 2 - Reagente da marca Invitrogen sem a adição de $MgCl_2$; 3 - Reagente Kappa sem adição de $MgCl_2$; 4, 5 e 6 - Curvas de amplificação com os reagentes Roche, Invitrogen e Kappa com adição de $MgCl_2$, respectivamente.

4.9. Aplicação Diagnóstica

4.9.1. Análise comparativa das qPCR HTLV nos formatos *single* e *multiplex*

Foram usadas 25 amostras de DNA provenientes de casos suspeitos de infecção por HTLV-1/2 do Grupo 2. Na análise comparativa o formato XqPCR HTLV detectou 19/25 amostras (76%) frente a 18/25 (72%) do ensaio *single*, com índice Kappa de 0,90 (IC 95% \pm 0,36). Apenas uma amostra (1*),

resultou positiva apenas na XqPCR para o HTLV-2 com Cq alto, o que é um resultado difícil de reproduzir (**Quadro 9**).

Quadro 9. Análise comparativa entre os resultados do ensaio de qPCR HTLV empregando o gene alvo *pol*, nos formatos *single* e *multiplex* para a detecção e identificação de HTLV-1, HTLV-2 e gene de referência em amostras da rotina diagnóstica.

HTLV gene <i>pol</i>					
Amostra	GR	Single		X-qPCR	
		HTLV-1	HTLV-2	HTLV-1	HTLV-2
1*	+	0	0	0	+
2	+	+	0	+	0
3	+	+	0	+	0
4	+	0	0	0	0
5	+	0	+	0	+
6	+	0	0	0	0
7	+	+	0	+	0
8	+	0	0	0	0
9	+	+	0	+	0
10	+	+	0	+	0
11	+	+	0	+	0
12	+	+	+	+	+
13	+	+	0	+	0
14	+	+	0	+	0
15	+	+	0	+	0
16	+	+	0	+	0
17	+	0	+	0	+
18	+	+	0	+	0
19	+	0	0	0	0
20	+	0	+	0	+
21	+	0	0	0	0
22	+	0	+	0	+
23	+	0	+	0	+
24	+	+	+	+	+
25	+	0	0	0	0

Legenda: * - Amostra 1 (Cq 39) - confirmado por WB e/ou outro qPCR (alvo *tax*); GR - gene de referência; + - positivo; 0 – negativo.

4.9.2. Sensibilidade diagnóstica relativa da XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) X WB

Para os testes de sensibilidade diagnóstica relativa foram usadas amostras de DNA de casos confirmados de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, pertencentes ao Grupo 1 (pacientes soronegativos para o HIV) e ao Grupo 2 (pacientes soropositivos para o HIV). Os resultados obtidos foram comparados com os do WB e nos discordantes com o ensaio sorológico (LIA) ou molecular (PCR-RFLP ou qPCR), cujos resultados encontram-se publicados em Campos et al. (2017), com exceção das amostras da UPE, que já vieram definidas como positivas para HTLV-1.

4.9.2.1. Casuística do Grupo 1 (HIV- / UPE e Rotina-IAL).

Das 39 amostras com suspeita de infecção pelo HTLV e que resultaram reagentes na triagem, 37 confirmaram infecção por HTLV-1 (29 do ambulatório de HTLV da UPE e oito da rotina-IAL) e duas resultaram negativas. O teste de referência WB detectou 37/37 amostras (100%; IC95% 88-102; \pm 0,07) e as duas XqPCRs (*pol* e *tax*) detectaram 36/37 amostras (97%; IC95% 76,9-84,6; \pm 0,07), com boa concordância entre os métodos, estimados pelo índice Kappa (0,787; IC95% \pm 0,384-1.000).

Os resultados são apresentados no **Quadro 10**, ressaltando que a amostra 8 mostrou resultados discrepantes entre os diferentes ensaios imunoenzimáticos utilizados na triagem, provavelmente devido a uma baixa CPV de HTLV-1.

Quadro 10. Resultados das XqPCRHTLV (*pol* e *tax*) em relação ao teste confirmatório de referência *Western Blot*, em amostras do Grupo 1, suspeitas de infecção por HTLV e soronegativas para o HIV.

N°	XqPCR_ <i>pol</i>	XqPCR_ <i>tax</i>	WB	N°	XqPCR_ <i>pol</i>	XqPCR_ <i>tax</i>	WB
1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	21	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	22	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
3	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
4	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	24	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
5	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
6	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	26	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
7	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	27	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
8*	NEG	NEG	HTLV-1	28	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
9	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	29	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
10	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	30	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
11	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	31	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
12	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	32	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
13	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	33	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
14	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	34	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
15	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	35	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
16	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	36	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
17	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	37	NEG	NEG	NEG
18	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	38	NEG	NEG	NEG
19	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	39	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
20	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1				

Legenda: NEG: Negativo; *amostra com resultados discrepantes entre repetições de ensaios imunoenzimáticos.

4.9.2.2. Casuística do Grupo 2 (HIV+ / CRT/aids e Rotina-IAL).

Das 152 amostras testadas, 118 (77,6%; IC95% 76,9-84,6; \pm 0,07) resultaram positivas [77 HTLV-1, 29 HTLV-2, 3 HTLV-1+2 e 9 HTLV não tipadas], 22 indeterminadas (14,5%) e 12 negativas (7,9%), à análise pelo WB. Pela XqPCR_ *pol* 101 resultaram positivas (66,4%; IC95% 57 -75,4; \pm 0,09), com coeficiente de correlação entre o WB e a XqPCR HTLV_ *pol* moderado (Kappa: 0,405; IC95%:0,251-0,559). Pela XqPCR_ *tax* 95 (62,5%; IC95% 52,7-72,2; \pm 0,09) foram positivas, com índice Kappa moderado (0,435; IC95%: 0,290-0,580) (**Quadros 11 e 12**).

Das 22 amostras com resultados de WB indeterminados, as XqPCRs identificaram pelo alvo *pol* 10/22 (45,5%) e 7/22 (32%) pela *tax*. Curiosamente, entre os casos confirmados, houve uma maior frequência de HTLV-2, sendo 9/10 (90%) empregando-se o alvo *pol* e 6/10 (60%) pela *tax*. Uma amostra foi identificada como HTLV-1 (1/10, 10%) nas duas XqPCRs. Já entre as nove amostras HTLV não tipadas pelo WB e/ou pelo LIA, 6/9 (66,7%) foram tipadas pelas XqPCR, sendo a maioria [4/6 (66,7%)] HTLV-1, três identificadas pelo alvo *pol* e quatro pela *tax*, e 2/6 (33,3%) HTLV-2, sendo duas pelo alvo *pol* e uma pela *tax*. (**Quadro 12**).

Se considerados apenas os casos positivos pelo WB (n=118), as duas XqPCR apresentaram sensibilidade diagnóstica relativa de 85,6% (101/118) para o alvo *pol* e 80,5% (95/118) para o alvo *tax*.

Quadro 11. Análise geral e comparativa de desempenho entre os testes XqPCR HTLV (*pol* e *tax*), *Western Blot* e LIA aplicados em amostras suspeitas de infecção por HTLV e soropositivas para o HIV (Gupo 2).

Teste	HTLV-1	HTLV-2	HTLV-1 + HTLV-2	HTLV	IND	NEG	POS	Total por técnica	Sensibilidade analítica %
WB	77	29	3	9	22	12	118	152	77,6
XqPCR_ <i>pol</i>	69	31	1			51	101	152	66,4
XqPCR_ <i>tax</i>	68	25	2*			57	95	152	62,5
LIA*	43	34	1	9	2		87	89	97,8

Legenda: WB: Western Blot; XqPCR: PCR em tempo real multiplex; LIA: Imunoensaio de linha (INNOLIA); HTLV: não tipado; IND: Indeterminado; NEG: negativo, POS: positivo, * 1 resultado discrepante, confirmado HTLV-1 pela RFLP no gene *tax*.

Ademais, houve resultados discrepantes entre os testes confirmatórios (Quadro 12). A amostra 40 confirmou infecção por HTLV-2 em três testes (WB, INNO-LIA e XqPCR_*pol*), e repetidamente HTLV-1 e HTLV-2 na XqPCR_*tax*, sendo que o HTLV-1 também foi detectado pela PCR-RFLP (Campos et al. 2017). As amostras 11 e 56 consideradas HTLV-1 e HTLV-2 pelo WB resultaram XqPCR HTLV (*pol* e *tax*) positivas apenas para HTLV-1. Em uma destas amostras (11) o LIA resultou indeterminado.

Quadro 12. Resultados da pesquisa de HTLV em amostras do **Grupo 2**, provenientes de pacientes soropositivos para HIV, do CRT/aids e rotina diagnóstica do IAL, submetidas aos ensaios de WB, XqPCR HTLV_*pol* e *tax* (n=152) e LIA (n=89).

N°	XqPCR_ <i>pol</i>	XqPCR_ <i>tax</i>	WB	LIA	N°	XqPCR_ <i>pol</i>	XqPCR_ <i>tax</i>	WB	LIA	N°	XqPCR_ <i>pol</i>	XqPCR_ <i>tax</i>	WB	LIA
1	HTLV-1	NEG	HTLV-1	HTLV-1	26	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	51	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	27	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1	52	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
3	HTLV-1/-2	HTLV-1/-2	HTLV-1/-2	HTLV-1/-2	28	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	53	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
4	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	29	HTLV-2	HTLV-2	IND	HTLV-2	54	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
5	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV	30	NEG	NEG	IND	HTLV-2	55	NEG	NEG	HTLV-2	NR
6	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	31	HTLV-1	HTLV-1	HTLV	NR	56	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1/-2	NR
7	HTLV-1	HTLV-1	IND	HTLV	32	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	57	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
8	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	33	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	58	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
9	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1	34	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	59	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
10	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	35	HTLV-2	HTLV-2	IND	NR	60	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
11	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1/-2	IND	36	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	NR	61	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
12	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	37	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	62	NEG	NEG	IND	NR
13	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	38	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	63	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
14	HTLV-2	HTLV-2	IND	HTLV-2	39	HTLV-2	NEG	HTLV-2	NR	64	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
15	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	40	HTLV-2	HTLV-1/-2*	HTLV-2	HTLV-2	65	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
16	NEG	NEG	NEG	HTLV	41	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	66	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
17	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	42	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	67	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
18	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	43	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	68	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
19	NEG	NEG	NEG	NR	44	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	69	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
20	HTLV-2	NEG	IND	HTLV-2	45	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	70	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
21	NEG	NEG	HTLV-1	NR	46	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	71	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
22	NEG	NEG	NEG	NR	47	NEG	NEG	NEG	IND	72	NEG	NEG	HTLV-2	NR
23	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1	48	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	73	NEG	NEG	IND	NR
24	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	49	NEG	NEG	HTLV-2	HTLV-2	74	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR
25	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	50	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	75	NEG	NEG	NEG	NR

Cont. Quadro 12.

N°	XqPCR_pol	XqPCR_tax	WB	LIA	N°	XqPCR_pol	XqPCR_tax	WB	LIA	N°	XqPCR_pol	XqPCR_tax	WB	LIA
76	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	102	NEG	NEG	IND	NR	128	HTLV-1	NEG	HTLV-1	HTLV-1
77	NEG	NEG	HTLV-1	NR	103	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	129	HTLV-2	NEG	HTLV	HTLV-2
78	NEG	NEG	IND	HTLV-2	104	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	130	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1
79	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	NR	105	NEG	NEG	HTLV-2	HTLV-2	131	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
80	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	106	NEG	NEG	HTLV	HTLV	132	NEG	NEG	IND	HTLV-2
81	NEG	NEG	NEG	NR	107	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	133	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
82	NEG	NEG	NEG	NR	108	NEG	HTLV-1	HTLV	HTLV	134	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
83	HTLV-2	HTLV-2	IND	NR	109	NEG	NEG	HTLV-2	HTLV-2	135	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
84	HTLV-2	HTLV-2	HTLV	NR	110	NEG	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	136	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
85	NEG	NEG	NEG	NR	111	NEG	NEG	IND	HTLV-1	137	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
86	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	NR	112	NEG	NEG	HTLV-2	HTLV-2	138	NEG	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
87	NEG	NEG	HTLV-1	NR	113	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	139	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
88	HTLV-1	HTLV-1	HTLV	NR	114	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	140	HTLV-1	NEG	HTLV-1	HTLV-1
89	NEG	NEG	HTLV-1	NR	115	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1	141	NEG	NEG	IND	HTLV-2
90	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	116	HTLV-2	NEG	IND	HTLV-2	142	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
91	NEG	NEG	NEG	NR	117	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	143	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
92	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	118	NEG	NEG	HTLV-2	HTLV-2	144	HTLV-2	HTLV-2	IND	HTLV-2
93	NEG	NEG	NEG	NR	119	HTLV-1	NEG	HTLV-1	HTLV-1	145	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
94	NEG	NEG	NEG	NR	120	HTLV-1	HTLV-1	HTLV	HTLV	146	HTLV-2	HTLV-2	IND	HTLV-2
95	NEG	NEG	HTLV-1	NR	121	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	147	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
96	NEG	NEG	NEG	NR	122	NEG	NEG	HTLV	HTLV-2	148	HTLV-2	NEG	IND	HTLV
97	NEG	NEG	IND	NR	123	NEG	NEG	IND	HTLV-2	149	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1
98	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	124	NEG	NEG	HTLV-1	HTLV-1	150	NEG	NEG	HTLV-2	HTLV-2
99	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	125	NEG	NEG	IND	HTLV	151	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
100	NEG	NEG	IND	NR	126	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	152	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
101	NEG	NEG	HTLV-2	NR	127	NEG	NEG	HTLV	HTLV					

Legenda: WB: Western Blot; LIA: imunoenensaio de linha (INNOLIA), NR: Não Realizado; NEG: negativo; IND: indeterminado.

4.9.3. Especificidade diagnóstica

Os resultados obtidos com as 30 amostras pertencentes ao Grupo 3, selecionadas para assegurar a especificidade das XqPCR HTLV_*pol* e *tax*, apresentaram resultado negativo (100%), para HTLV-1 e HTLV-2, com positividade apenas para o gene de referência, ou seja, as duas XqPCR HTLV foram 100% específicas, sem resultados falso-positivos.

4.9.4. Precisão

A **Tabela 3** mostra os resultados de precisão inter-ensaios de 10 amostras com concentrações variáveis de analito, demonstrando pouca variação e boa correlação de positividade e detecção (100%) nas XqPCR para baixas concentrações, estimadas por ciclos de amplificação de HTLV-1, passando a ser crítico (22%) nas concentrações enquadradas na faixa tardia de amplificação > 36. Ainda, foram observados valores muito próximos de ciclos de amplificação/detecção para HTLV-1 entre as duas XqPCR (*pol* e *tax*) propostas.

Já para o HTLV-2, houve uma diferença nos valores de ciclo de detecção de aproximadamente três Cqs entre os alvos *pol* e *tax*. Embora, tenha apresentado ciclos de amplificação/detecção menores, o alvo *tax* mostra maior dificuldade de detecção a partir do ciclo 37, demonstrando aparentemente, melhor precisão e sensibilidade de detecção do gene *pol* para o HTLV-2 em relação ao gene *tax*.

Sequencialmente, na **Tabela 4**, estão compilados os resultados de reprodução e precisão intra-ensaio, de duas amostras em seis réplicas realizadas no mesmo ensaio, com coeficiente de variação inferior a 0,05, que é requerido para ensaios quantitativos, demonstrando boa precisão e reprodução dos resultados.

Tabela 3. Análises de precisão e reprodução (inter-ensaio) de 10 amostras biológicas, com concentrações de DNA estimadas em alta, média, baixa e escassa, em duplicatas, submetidas a quatro desafios/repetições/dias, na XqPCR HTLV (*pol* e *tax*), simultaneamente.

	HTLV-1 <i>pol</i>								HTLV-1 <i>tax</i>								HTLV-2 <i>pol</i>								HTLV-2 <i>tax</i>							
	AM	REP	Cq	MÉDIA	DP	VAR	DET%		AM	REP	Cq	MÉDIA	DP	VAR	DET%		AM	REP	Cq	MÉDIA	DP	VAR	DET%		AM	REP	Cq	MÉDIA	DP	VAR	DET%	
alto	1	1	25,0 25,0	25	0,00	0,00	100		1	1	26,4 26,4	26	0,00	0,00	100		6	1	29,0 29,0	29	0,00	0,00	100		6	1	26,7 26,7	27	0,00	0,00	100	
alto	2	1 2 3 4	28,9 28,0 28,9 28,9 29,0 29,4 29,5 28,6	29	0,43	0,24	100		2	1 2 3 4	28,8 28,9 28,8 28,8 28,9 29,2 28,8 28,7	29	0,14	0,02	100		7	1 2 3 4	32,2 32,5 32,5 32,5 32,8 32,5 32,3 32,6	33	0,17	0,04	100		7	1 2 3 4	29,7 29,7 29,8 30,0 30,7 30,5 29,6 29,7	30	0,37	0,17	100	
médio	3	1 2 3 4	32,7 32,2 32,6 32,6 32,6 32,4 32,6 33,4	33	0,31	0,12	100		3	1 2 3 4	32,3 33,3 32,2 33,3 32,8 32,5 32,6 32,4	33	0,39	0,19	100		8	1 2 3 4	35,8 35,4 35,8 35,7 35,9 36,2 35,8 34,7	36	0,38	0,18	100		8	1 2 3 4	32,9 32,8 32,9 32,7 34,2 32,8 32,9 31,3	33	0,70	0,63	100	
baixo	4	1 2 3 4	35,8 35,6 35,9 36,4 36,0 36,1 35,8 35,9	36	0,21	0,06	100		4	1 2 3 4	35,8 35,7 34,9 34,5 36,9 35,7 35,9 35,2	36	0,63	0,52	100		9	1 2 3 4	39,3 38,0 39,4 39,3 39,4 38,2 38,5 38,5	39	0,50	0,32	100		9	1 2 3 4	34,9 36,4 34,5 36,4 38,2 35,7 36,4 35,9	36	0,99	1,26	100	
escasso	5	1 2 3 4	0,0 0,0 0,0 0,0 37,0 0,0 0,0 37,8	38	17,73	299,8	22		5	1 2 3 4	37,5 37,6 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0	38	17,76	301,7	22		10	1 2 3 4	0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 40,0	40	16,63	199,9	13		10	1 2 3 4	0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0 0,0	0	0,00	0,0	0	

AM: amostra; REP: repetição; Cq: ciclo de quantificação; DP: desvio padrão; VAR: variação; DET: detecção;

Tabela 4. Resultados de reprodução e precisão em duas amostras com 6 réplicas no mesmo ensaio de XqPCR HTLV.

Replicatas	Amostra 1	Amostra 2
	Cq	Cq
1	20,8	21,3
2	20,8	21,3
3	21,0	21,2
4	21,3	21,3
5	20,8	21,4
6	20,7	20,9
Média	20,9	21,2
DP	0,2	0,2
CV%	1	0,7
Variância	0,05	0,02
IC95%	0,05	0,04

Legenda: Cq - ciclo de quantificação/detecção da amplificação; DP - desvio Padrão; CV% - coeficiente de variação; IC - intervalo de confiança.

4.9.5. Ensaio de quantificação da carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 - aplicação diagnóstica.

O **Quadro 13** mostra a aplicação da XqPCR_*pol* no monitoramento de pacientes em seguimento junto ao CRT-DST/aids, que resultaram positivos para HTLV-1 ou HTLV-2. Foi possível obter material biológico e submeter à quantificação de CPV na XqPCR HTLV_*pol*, 16 amostras clínicas, das quais 4 (25,00%) resultaram negativas, 7 (43,75%) positivas para o HTLV-1 e 5 (31,25%) para o HTLV-2. Infelizmente, devido à escassez de volume e emprego das amostras em outros estudos, não foi possível aplicar o mesmo ensaio para o alvo tax. As **Figuras 20 e 21** exemplificam a plotagem dos Cq das amostras submetidas à quantificação da carga proviral nas curvas padrão, obtidas nas plataformas ROCHE e ABI.

Quadro 13. Resultados de quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2 em amostras de pacientes previamente positivos empregando-se a XqPCR HTLV_*pol*.

XqPCR quantitativa							
Amostra	HTLV-1			HTLV-2			Gene de referência
	Cq	Cópias		Cq	Cópias		Cq
		[5uL]	[10 ⁵ células]		[5uL]	[10 ⁵ células]	
1	0	0	0	27	136000	272000	24
2	32	245	490	0	0	0	23
3	27	9380	18760	0	0	0	24
4	0	0	0	0	0	0	24
5	0	0	0	36	260	520	23
6	0	0	0	0	0	0	23
7	0	0	0	33	2020	4040	24
8	27	9140	18280	0	0	0	23
9	31	633	1266	0	0	0	23
10	0	0	0	0	0	0	25
11	0	0	0	0	0	0	23
12	0	0	0	33	2390	4780	23
13	33	135	270	0	0	0	25
14	26	21100	42200	0	0	0	24
15	0	0	0	33	1960	3920	23
16	31	953	1906	0	0	0	23

Legenda: Cq – ciclo de quantificação; 0 – negativo; [] – concentração. Cálculo de carga proviral segundo descrito em Métodos.

A **Figura 20 (A)** ilustra as curvas obtidas em amostras positivas para o HTLV-1, em vermelho, onde se verifica uma curva na cor vinho empregando uma das concentrações presentes na curva padrão molde, salva pelo software, que serviu como referência para o cálculo da quantificação das amostras do ensaio. Em **(B)** está ilustrada a curva padrão com as quantidades do padrão em vermelho, a qual serviu de molde para interpolar as quantidades presentes do HTLV-1 em cópias/5µL nas amostras pesquisadas. As quantidades apresentadas pelo software são resultantes do total do alvo amplificado na reação, sem ajustes adicionais.

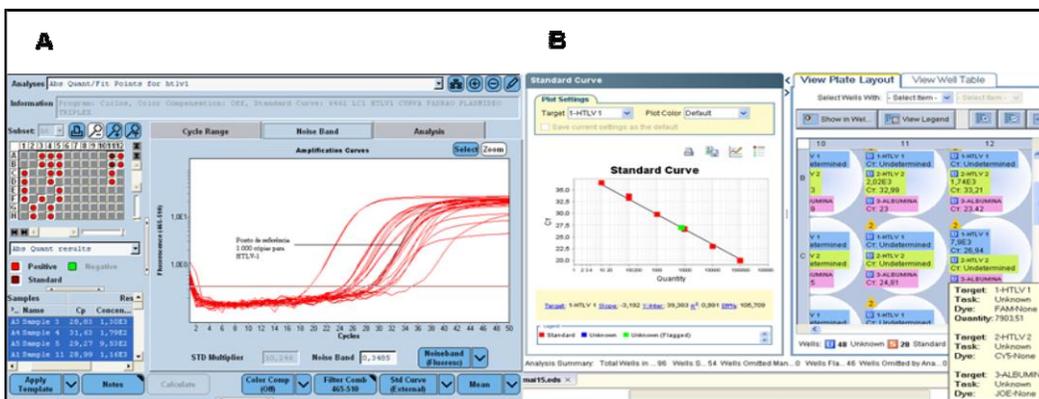


Figura 20. Plotagem da curva de amplificação - quantificação HTLV-1.

Legenda: Plotagem da curva de amplificação para o HTLV-1 na análise de quantificação na plataforma e software Roche LightCycler 480II (A) e curva padrão na plataforma ABI 7.500 (B).

A **Figura 21** mostra a curva de quantificação obtida em amostras positivas para o HTLV-2, as quais foram inseridas na curva padrão, levando em consideração as concentrações e número de cópias conhecidos do plasmídeo, que serviu de referência para o cálculo de CPV, com ajustes do gene pesquisado na amostra biológica.

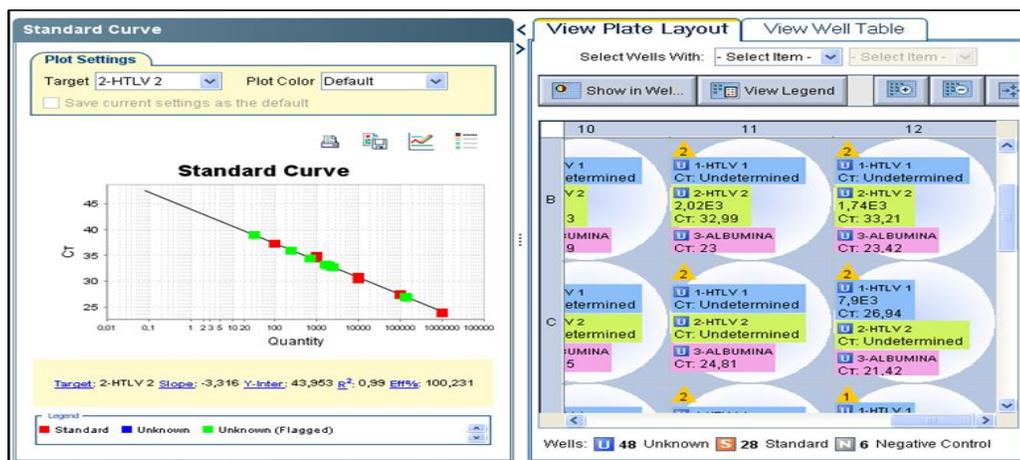


Figura 21. Plotagem da curva de amplificação - quantificação HTLV-2.

Legenda: Plotagem da curva de amplificação na análise de quantificação para o HTLV-2 na plataforma e software Applied Biosystems (ABI 7.500), cujos pontos plotados em verde indicam amostras quantificadas frente a pontos da curva padrão (em vermelho, à esquerda) e quantificação total do gene indicada a esquerda (valores brutos).

4.9.6. Cálculos de Probit

Os cálculos de regressão linear (Probit) estimaram um LMQ de 2 cópias para HTLV-1 e 19 cópias para HTLV-2 na XqPCR HTLV_*pol* e de 3 cópias para o HTLV-1 e 31 cópias para HTLV-2 na XqPCR HTLV_*tax*.

4.9.7. Análise de Custos

As estimativas de custos dos ensaios de XqPCR HTLV propostos, assim como os ensaios sorológicos confirmatórios disponíveis no comércio (WB e INNO-LIA) foram realizadas com base nos valores dos insumos adquiridos pelo IAL no ano de 2018. Para as XqPCR HTLV, dependendo da forma de extração de DNA (se manual ou automatizada) os valores foram distintos. Assim, para a XqPCR_*pol* e XqPCR-*tax* por extração manual os valores estimados foram de R\$ 37,00 e R\$ 36,00 por teste, respectivamente, enquanto por extração automatizada estes valores se elevaram para R\$ 83,00 e R\$ 82,00, respectivamente. Já o WB foi cotado em R\$ 162,00 e o LIA em R\$ 168,00, cada tira.

Quando aplicada a XqPCR HTLV como primeiro teste confirmatório, em diferentes algoritmos de testes laboratoriais para diagnóstico de HTLV-1/2, em amostras clínicas de indivíduos sem a infecção por HIV, a redução de custos foi de cerca 70% (**Quadro 14**), enquanto para os infectados pelo HIV, ou seja, que dependem muito mais do teste sorológico para confirmar esta infecção viral, a redução de custos variou de 32,5% a 39,3%, dependendo do algoritmo empregado (**Quadro 15**).

Quadro 14. Análise de custos de algoritmos de testes confirmatórios sorológicos (WB ou INNOLIA) e moleculares [XqPCR HTLV (*pol* ou *tax*)] para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2, em população sem a infecção pelo HIV.

Proposta 1 - XqPCR _{pol} X WB			Proposta 2 - XqPCR _{tax} X WB		
Teste^a	Extração		Teste^a	Extração	
XqPCR_{pol}	manual	robo	XqPCR_{tax}	manual	robo
n=39	1443	3237	n= 39	1404	3198
WB			WB		
n=03	486	486	n=03	486	486
Total (R\$)	1929	3723	Total (R\$)	1890	3684
Teste^b	Extração		Teste^b	Extração	
WB			WB		
n=39	6318	6318	n=39	6318	6318
XqPCR_{pol}			XqPCR_{tax}		
n=02	74	166	n=02	72	164
Total (R\$)	6392	6484	Total (R\$)	6390	6482
Economia^a (R\$)	4463	2761	Economia^a (R\$)	4500	2798
%	69,82	42,58	%	70,42	43,17

Legenda: ^a – ensaio molecular como primeiro teste confirmatório; ^b – ensaio sorológico como primeiro teste confirmatório.

Quadro 15. Análise de custos de algoritmos de testes confirmatórios sorológicos (WB ou INNOLIA) e moleculares [XqPCR HTLV (*pol* ou *tax*)] para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2, em população infectada pelo HIV.

Proposta 1 - XqPCR _{pol} X WB			Proposta 2 - XqPCR _{pol} X LIA		
Teste^a	Extração		Teste^a	Extração	
XqPCR_{pol}	manual	robo	XqPCR_{pol}	manual	robo
n=50	1850	4150	n=50	1850	4150
WB			LIA		
n=21	3402	3402	n=21	3528	3528
Total (R\$)	5252	7552	Total (R\$)	5378	7678
Teste^b	Extração		Teste^b	Extração	
WB	manual	robo	LIA	manual	robo
n=50	8100	8100	n=50	8400	8400
XqPCR_{pol}			XqPCR_{pol}		
n=15	555	1245	n=6	222	498
Total (R\$)	8655	9345	Total (R\$)	8622	8898
Economia^a (R\$)	3403	1793	Economia^a (R\$)	3244	1220
%	39,32	19,19	%	37,62	13,71
Proposta 3 - XqPCR _{tax} X WB			Proposta 4 - XqPCR _{tax} X LIA		
Teste^a	Extração		Teste^a	Extração	
XqPCR_{tax}	manual	robo	XqPCR_{tax}	manual	robo
n= 48	1728	3936	n= 48	1728	3936
WB			LIA		
n=23	3726	3726	n= 23	3864	3864
Total (R\$)	5454	7662	Total (R\$)	5592	7800
Teste^b	Extração		Teste^b	Extração	
WB	manual	robo	LIA	manual	robo
n=48	7776	7776	n=48	8064	8064
XqPCR_{tax}			XqPCR_{tax}		
n=15	540	1230	n=6	216	492
Total (R\$)	8316	9006	Total (R\$)	8280	8556
Economia^a (R\$)	2862	1344	Economia^a (R\$)	2688	756
%	34,42	14,92	%	32,46	8,84

Legenda: ^a – ensaio molecular como primeiro teste confirmatório; ^b – ensaio sorológico como primeiro teste confirmatório.

5. DISCUSSÃO

5.1. Padronização/otimização e indicadores de desempenho dos testes propostos.

Tendo em vista os altos custos dos exames sorológicos confirmatórios de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 aliado ao fato do teste de WB (o mais empregado no país) resultar em altos percentuais de amostras com padrão indeterminado ou HTLV-não tipado, principalmente quando aplicado em amostras de populações com a coinfeção HIV/HTLV, técnicas moleculares que pesquisam segmentos do genoma proviral destes vírus foram introduzidas no Brasil e em todo o mundo. Ensaios *in house* foram e são desenvolvidos frequentemente por laboratórios de pesquisa ou de referência, quer seja pela ausência no mercado de um teste voltado ao analito/patógeno de interesse (por ser raro e/ou não rentável economicamente), ou ainda para solucionar problemas emergentes na medicina diagnóstica e vigilância laboratorial (Burd, 2010). Ademais, apesar do uso generalizado de testes moleculares, ainda há dúvidas quanto aos requisitos necessários para disponibilizar um teste molecular (Burd, 2010). Algumas características de desempenho são imprescindíveis e devem ser avaliadas, como: sensibilidade analítica (limite de detecção), sensibilidade diagnóstica, especificidade analítica e diagnóstica, precisão intra-ensaio (repetibilidade), precisão inter-ensaio (reprodutibilidade) e linearidade (para propostas quantitativas), Rabenau et al. (2007).

Na prática, na maioria das vezes, as técnicas moleculares *in house* para o diagnóstico de HTLV-1/2 não foram validadas e vêm sendo empregadas como rotina em vários serviços do país. Além disto, elas apresentam formatos distintos o que impossibilita uma análise comparativa dos resultados obtidos, por diferentes grupos de pesquisadores.

Desde o início da década de 1990, técnicas de nPCR, com ou sem hibridização líquida, para pesquisa de diferentes segmentos do genoma proviral

de HTLV-1 e HTLV-2 (LTR, *pol*, *env* e *tax*) foram utilizadas sem haver uma padronização em relação aos *primers* e região a ser pesquisada (Heneine et al., 1992; De-Araujo et al., 1994; Garin et al., 1994, Vallejo e Garcia-Sáiz, 1995; Soldan et al., 1999, Poiesz et al., 2000; Costa et al., 2006; Costa e Segurado, 2009). Ademais, não houve critério único para se considerar uma amostra como sendo positiva, ou seja, alguns estudos consideraram positivas amostras que identificavam apenas um segmento de uma região do genoma proviral, enquanto outros, só quando havia positividade para pelo menos dois segmentos, de regiões genômicas distintas (Matsumoto et al., 1990; Garin et al., 1994; Caterino-de-Araujo et al., 1998; Mangano et al., 2004; Morimoto et al., 2007; Zanjani et al., 2011).

Porém, foi padronizada uma técnica simples, de nPCR que amplifica parte da região *pX* (*tax*) comum aos dois tipos virais, mas que apresenta trocas de nucleotídeos que restringem os sítios de ação das enzimas *TaqI* e *Sau3I* (PCR-RFLP), possibilitando discriminar HTLV-1 de HTLV-2 (Tuke et al., 1992). Apesar de esta técnica ser da década de 1990, é usada ainda hoje rotineiramente no Brasil, para diagnóstico confirmatório e discriminatório de HTLV-1 e HTLV-2 por vários grupos de pesquisa (Universidade Federal do Pará, Fundação Oswaldo Cruz- Bahia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo) e também no exterior, com a ressalva de que em alguns laboratórios emprega-se apenas a *TaqI* (Tuke et al., 1992; Gallego et al., 2004; Mangano et al., 2014; Vallinoto et al., 2004, 2006; Laurentino et al., 2005; Souza et al., 2006; Berini et al., 2007, 2012; Casseb et al., 2007; Ishak et al., 2007; Zehender et al., 2007; Montanheiro et al., 2008; Costa e Segurado, 2009; Olah et al., 2010; Costa et al., 2011; Oliveira et al., 2010; Costa et al., 2013; Paiva et al., 2016).

Também em meados de 1990, foi produzido um *kit* para o diagnóstico molecular confirmatório de infecção por HTLV-1/2 pela empresa ROCHE, o Amplicor HTLV-I/II, e ele empregava a técnica de nPCR-*hibridization* com detecção de cor e pesquisava segmento *pol* de HTLV-1/2 (Vrieland et al., 1997). Porém, este *kit* não foi usado como rotina diagnóstica ou pesquisa no Brasil,

tampouco ao redor do mundo, havendo poucas publicações disponíveis (Vrieland et al., 1997; Liu et al., 1999). Assim, pela escassa procura, sua produção foi descontinuada.

Posteriormente, foram desenvolvidas as técnicas de PCR em tempo real (qPCR) usando diferentes protocolos de reação, *primers*, sondas e sistemas de detecção (SybrGreen e sondas de hidrólise), nos formatos *single* e *multiplex*. Foram escolhidos para estas padronizações a pesquisa de segmentos *pol* ou *tax* de HTLV-1 e HTLV-2, e utilizados como controle endógeno/gene de referência da reação a pesquisa dos genes: albumina humana, beta-actina humana, beta-globulina humana, HLA-DQ, VER-3, RNase P, CD81 humano, GAPDH. Como material de referência foram usadas linhagens infectadas por HTLV-1 ou HTLV-2 (MT2, MT4, C19) e plasmídeos (**Quadro 1** em anexo).

Muitos laboratórios passaram a empregar essas qPCR com finalidade diagnóstica e de monitoramento de CPV nos pacientes (Césaire et al., 2001; Estes e Sevall, 2003; Kamihira et al., 2003; Lee et al., 2004; Murphy et al., 2004; Montanheiro et al., 2005, 2008; Olindo et al., 2005; Yakova et al., 2005; Best et al., 2006; Tamegão-Lopes et al., 2006; Vitone et al., 2006; Arruda et al., 2008; Besson e Kazanji, 2009; Primo et al., 2009; Olah et al., 2010; Costa et al., 2011; Neto et al., 2011; Cabral et al., 2012; Olavarria et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Souza et al., 2012, Castro et al., 2013; Abad-fernandez et al., 2014; Ishihara et al., 2014; Cánepa et al., 2015; Nasir et al., 2015, Paiva et al., 2016). Porém, poucos foram os laboratórios que ao empregá-las, tiveram o cuidado de, além de padronizá-las para as condições do seu laboratório, validá-las (Vet et al., 1999; Moens et al., 2009; Andrade et al., 2010; Furtado et al., 2012; Rosadas et al., 2013).

O único estudo multicêntrico de proficiência intra- e inter-laboratorial para determinação de CPV de HTLV-1 disponível na literatura foi realizado no Japão, por Kamihira e colaboradores (2010). Os autores mostraram claramente a necessidade de unificar os protocolos de reação, pois utilizando as mesmas

amostras de DNA (n=60) para serem testadas em diferentes laboratórios e por diferentes analistas, usando a qPCR padronizada em cada um deles, mostraram numa primeira avaliação, o quão variáveis podem ser os resultados obtidos devido a protocolos distintos. Nesta fase do estudo, encontraram um coeficiente de variação de 44,9% (variando de 25,4% a 71,8%) entre analistas do mesmo laboratório, e 59,9% (34,2% a 93,4%) entre seis laboratórios participantes. Numa segunda etapa, uma vez definido o protocolo, e utilizando 20 amostras de DNA, plasmídeos contendo a região *pX* como material de referência e controle interno de normatização da reação, os resultados obtidos entre os analistas foram semelhantes (Kamihira et al., 2010).

Atualmente existe um *kit* comercial para pesquisa de HTLV-1/-2 com proposta de comercialização no Brasil pela empresa Medivax. Ele emprega um plasmídeo composto por regiões dos segmentos *pol* do HTLV-1 e HTLV-2 com estimativa de detecção de até 2 cópias de HTLV, de acordo com a concentração apresentada pelo plasmídeo. Porém, não consta seu registro na ANVISA, e ainda necessita ser avaliado com painel de amostras de DNA de pessoas infectadas pelos HTLV-1/2 do Brasil. Ainda, outro ensaio de qPCR de procedência nacional, amplamente divulgado em congressos e na mídia desde o ano de 2010, não logrou ser produzido e comercializado, não havendo, igualmente, seu registro na ANVISA (Rocha Junior, 2014; Patente BR 102014024905-2 A2, depositada em 06/10/2014 e publicada em 12/04/2016).

Como o IAL é um Laboratório de Referência Nacional para vários agravos de importância em Saúde Pública, e como toda a técnica desenvolvida com propósito diagnóstico nesta Instituição deve contemplar os parâmetros estabelecidos no Manual de Validação do IAL (P-SG-0022), foi desenvolvido o presente estudo.

Durante a fase de otimização da XqPCR HTLV_*pol* e a padronização da XqPCR HTLV_*tax*, vale destacar que para a confirmação da especificidade dos oligonucleotídeos e de sua capacidade em parear com sequências de DNA proviral de isolados de HTLV-1 e HTLV-2 do Brasil, a análise realizada no

algoritmo BLAST mostrou variação entre as bases A e G, na posição 4780 do genoma proviral dos HTLV-2, necessitando de adequação na sequência da sonda empregada para esta detecção, principalmente entre isolados brasileiros. Cabe salientar que essa alteração não está localizada próxima a terminação 5' da sonda, o que poderia acarretar na instabilidade de ligação da mesma à sequência complementar no DNA molde (Marras et al., 2002; Dehée et al., 2002). Ademais, os oligonucleotídeos empregados neste estudo apresentaram 100% de especificidade na detecção de HTLV-1/-2, quando as XqPCR foram testadas em amostras de pacientes infectados por outros vírus.

Igualmente, a linearidade da curva padrão para os alvos genéticos *pol* e *tax* usando o ensaio no formato *multiplex* foi comparada com a curva do ensaio correspondente no formato *single*, já que a complexidade de múltiplos alvos num mesmo ensaio poderia acarretar na redução da sensibilidade do mesmo. Isto poderia ocorrer devido a uma possível competição entre as químicas e/ou alvos presentes, ou mesmo pela interferência ou cinética em que a amplificação de um alvo poderia gerar em relação ao outro na reação. Desta forma, era de se esperar que a sensibilidade do ensaio *multiplex* fosse menor que a do ensaio *single*, porém isto não ocorreu. As linearidades das curvas foram quase idênticas, permitindo a utilização de ambos os formatos para os alvos genéticos *pol* e *tax*. Apoiando esses dados, os resultados em amostras clínicas das análises comparativas entre os dois formatos para o gene *pol* (4.9.1) mostraram resultados similares, divergindo apenas em uma amostra cuja quantidade de cópias de DNA proviral se encontrava no limite de detecção do teste.

Burd (2010) reportou que análises de linearidade aferidas por reações de LMD não são obrigatórias, porém desejáveis, visto que demonstram a capacidade/sensibilidade do teste, e devem refletir possíveis concentrações do analito presente em amostras clínicas, sem necessariamente indicar precisão na sua detecção. Uma vez que, nos testes de LMD, os dois últimos pontos apresentaram um intervalo considerável, devido ao formato do teste/diluição seriada ser em \log_{10} , foram realizados, no presente estudo, testes com diluições

intermediárias a fim de encontrar o menor limite com maiores chances (95%) de detecção. Desta forma, foram definidos os LMD de 5 e 6 cópias para o HTLV-1 e 26 e 30 cópias para o HTLV-2, nos alvos *pol* e *tax*, respectivamente.

Outro fato relevante que merece ser destacado no presente estudo, foi que tanto a padronização quanto a otimização das XqPCR HTLV foram realizadas com plasmídeos, e não com material biológico (DNA) de pacientes. Sabe-se que durante a padronização de um novo ensaio é necessário, se possível, empregar materiais de referência certificados, culturas/isolados, linhagens estabelecidas, DNA concentrado de microrganismos, genes sintéticos certificados (plasmídeos), porém raramente são utilizadas amostras clínicas, devido ao fato de não haver disponibilidade de grandes quantidades deste material. Sendo assim, as técnicas padronizadas geralmente desconsideram fatores intrínsecos do paciente, que são revelados apenas na amostra biológica e que podem interferir na acurácia diagnóstica.

Quanto ao emprego de plasmídeos como material de referência na qPCR HTLV, por apresentarem maior estabilidade e resultarem em menor coeficiente de variação na determinação de CPV de HTLV-1 (Dehée et al., 2002; Kamihira et al., 2010), estes foram utilizados no presente estudo; lembrando que os plasmídeos que continham a região *pol1* e *pol2* foram doados por outras Instituições e apenas expandidos no IAL, enquanto os que continham a região *tax1* e *tax2* foram desenhados e expandidos no IAL.

Para sua utilização, primeiramente avaliou-se a estabilidade das concentrações dos plasmídeos na confecção de curvas cujos resultados mostraram melhor estabilidade do plasmídeo contendo o gene *tax* em relação ao gene *pol*, principalmente para o HTLV-2, para o qual deve ser sempre efetuada as quatro últimas diluições. Isto pode hipoteticamente ter ocorrido devido ao fato dos plasmídeos originários de outros Institutos terem sofrido alguma degradação (após várias expansões) ou terem sido manipulados de forma inadequada, enquanto os plasmídeos contendo segmento *tax* foram sintetizados recentemente e expandidos apenas uma vez no IAL. De todo

modo, cabe salientar que, na aplicação de testes quantitativos é aconselhável a diluição da curva padrão no dia da reação, pelo menos para pontos com menores concentrações, entre 10^3 e 1 cópia, para minimizar a interferência de fatores externos, degradação, entre outras. Ainda, e corroborando os resultados obtidos, sabe-se que em altas concentrações de DNA há maior estabilidade do plasmídeo do que em baixas concentrações. Além disso, a maioria dos *softwares* que acompanham as plataformas de qPCR disponíveis no mercado, permitem o arquivo de dados em pastas ou nuvem, e o emprego desses dados para análises comparativas de reações futuras. Porém, deve-se ter em mente que, caso haja a necessidade de extrema precisão na análise, a comparação entre os valores não computará possíveis erros ou desvios ocorridos em dias e reações distintas.

Adicionalmente, para a utilização de plasmídeos, foram realizados estudos de LMQ que dependem da precisão do teste (Rabenau et al., 2007; ANVISA-RE 899/29/5/03). Os resultados estimados pelo cálculo do Probit, para os limites inferiores de quantificação de HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente, mostraram valores de 2 e 19 cópias para os alvos *pol1* e *pol2* e, 3 e 31 cópias para *tax1* e *tax2*. Há que se ressaltar que o emprego desses plasmídeos na quantificação de CPV, não utilizou o gene da albumina humana como normalizador, optando-se pela quantificação absoluta, por dois motivos: i) em amostras de pacientes com aids e com CPV de HTLV indetectável ou no limite de detecção do teste, espera-se encontrar quantidades muito superiores do gene de referência que monitora DNA humano (albumina), em relação a detecção de HTLV, dificultando a quantificação normalizada pelo gene de referência; ii) ainda, algumas falhas neste alvo (em torno de 12,5%) foram detectadas nos plasmídeos-compostos nas concentrações abaixo de 50 cópias para HTLV-2 e 10 cópias para HTLV-1. Curiosamente, apesar dos plasmídeos contendo a região *tax* serem mais estáveis, quando considerada a precisão do teste, eles mostraram LMQ de maior valor.

Em relação à disponibilidade de diferentes marcas de reagentes comerciais e sua aplicação nas XqPCR HTLV, os resultados obtidos foram satisfatórios mostrando eficiências superiores a 90% e inferiores a 112%, estando dentro dos valores estabelecidos para ensaios *multiplex* (80% a 120%) (Broeders et al., 2014). Destacando-se que esta análise foi realizada, pois em laboratórios públicos os insumos são adquiridos por processos de licitação/pregão eletrônico, onde prevalece o menor preço. Além disto, no IAL não há estrutura disponível para desenvolver os próprios reagentes, o que poderia contornar esta situação.

Todavia, para uma aplicação quantitativa, reagentes com menor limite de detecção e maior eficiência devem ser levados em consideração. Neste sentido, os melhores resultados foram obtidos com a *master mix* PerfeCTa qPCR ToughMix (Quantabio), porém seu elevado custo (o maior entre todas as marcas testadas) inviabiliza sua utilização na rotina diagnóstica. Entretanto, como já informado, todas as marcas mostraram resultados de eficiência satisfatórios e podem ser empregadas nas XqPCR HTLV.

Ainda, caso a opção empregue a normalização pelo gene de referência/controlado endógeno, as eficiências entre os alvos comparativos devem ser equivalentes, condição esta desnecessária em aplicações qualitativas, no qual o gene de referência poderá ter sua expressão reprimida em favorecimento aos alvos principais vinculados ao diagnóstico da infecção (Tuomi et al., 2010; Handbook real time PCR-ABI) .

Quanto a reprodução dos ensaios por diferentes profissionais, esta foi extremamente satisfatória, com variação inferior a 1; de forma similar os coeficientes de variação (precisão) intra- e inter-ensaios apresentaram pouca variação, se inserindo na faixa entre 3% a 10%, estabelecida como aceitável, conforme reportado por outros autores (Rosadas et al., 2013; Dehée et al., 2002; Estes and Sevall, 2003; Moens et al., 2009). Ainda, podem ser incluídas nesta faixa de variação, a reprodução e estabilidade da curva padrão, aferidas após mudanças de temperatura, com excelente reprodução dos resultados.

Além disso, as reações apresentaram boa eficiência e capacidade de detectar baixas concentrações de DNA proviral frente a nove diferentes marcas de reagentes comerciais em plataforma aberta, sendo aplicáveis a ensaios quali e quantitativos, conforme exposto.

5.2. Aplicação diagnóstica

Após serem estabelecidas as condições dos ensaios propostos, houve a necessidade de sua validação em amostras clínicas. Isto foi realizado no presente estudo, destacando-se que o material a ser analisado era proveniente, principalmente, de projeto de pesquisa de coinfeção HIV/HTLV e da rotina diagnóstica do IAL, onde também, a maioria dos casos com a infecção HTLV provinha de centros de acompanhamento de pacientes com HIV/aids (n=152).

Este fato poderia gerar um viés de interpretação de resultados, pois os cálculos de sensibilidade diagnóstica seriam apenas para esta população. No entanto, para contornar esta situação, foram analisadas pela XqPCR HTLV amostras de DNA de outro projeto de caracterização molecular dos HTLV-1 que circulam em Recife-PE e de alguns casos da rotina diagnóstica de HTLV-1/2, todos sem a infecção por HIV (n=39). Estas amostras procediam de bancos de sangue ou ambulatorios de HTLV, e a maioria incluía portadores de HTLV-1, sem sintomatologia clínica (dados fornecidos pela Dra. Patrícia Moura de Recife-PE, e não apresentados), nos quais, as técnicas moleculares, em teoria, poderiam resultar 100% positivas. De fato, e corroborando esta hipótese, na população sem a infecção por HIV, as XqPCR HTLV resultaram 97% positivas. O único caso negativo pela XqPCR e que resultou positivo para HTLV-1 no WB, tratava-se de paciente com CPV abaixo do limite de detecção do teste, e cujos resultados de triagem foram discordantes em duas avaliações (dados não apresentados), sugerindo, portanto, poucas partículas virais e baixo título de anticorpos circulantes.

Houve também a necessidade de comparar os testes propostos frente a um padrão ouro, e na sua ausência a outro ensaio de uso rotineiro, configurando assim sensibilidade e especificidade relativas. Neste contexto, foram realizadas análises comparativas para os cálculos de sensibilidade e especificidade analítica/diagnóstica relativas das XqPCR HTLV frente ao WB (teste mais empregado no Brasil) e em algumas amostras, também a outro teste sorológico confirmatório, o LIA. Os resultados obtidos mostraram menor sensibilidade das XqPCR HTLV em relação a estes testes, em população infectada pelo HIV. Todavia, há que se ressaltar que os testes sorológicos e moleculares empregam pesquisa de diferentes analitos (anticorpos específicos versus segmentos do genoma proviral, respectivamente) o que dificulta uma comparação entre eles. Isto explica os valores obtidos com o índice Kappa.

Para fornecer explicações sobre as possíveis causas de resultados negativos nas técnicas moleculares de diagnóstico de infecção por HTLV, Matsumoto et al. (1990) compararam os resultados da nPCR da região *pX* frente a pesquisa de anticorpos por imunofluorescência indireta (IFI), e mostraram que em amostras com títulos baixos de anticorpos havia menor positividade na nPCR. Isto porque havia menor CPV de HTLV, e conseqüentemente, menor resposta de anticorpos específicos. Estes dados concordam com o resultado obtido no único caso XqPCR falso negativo detectado no grupo sem a infecção por HIV, do presente estudo.

Vários fatores foram apontados como prejudiciais à detecção de segmentos do genoma proviral de HTLV-1/2, independentemente do teste molecular empregado, como: baixa CPV e/ou ausência de partículas virais no sangue circulante, deleção/mutação na região gênica pesquisada, infecção pelo HIV, uso de terapia antirretroviral (TARV), gênero feminino, infecção por HTLV-2, entre outras (Machuca e Soriano, 2000; Montanheiro et al., 2008; Costa et al., 2011; Kuramitsu et al., 2017).

No presente trabalho, algumas explicações sobre a baixa sensibilidade das XqPCR ganham suporte, como por exemplo as diferenças verificadas na

positividade das XqPCR entre infectados e não infectados pelo HIV, e entre os grupos com HIV em uso e sem o uso de TARV. Quando analisada separadamente a casuística do CRT DST/aids (n=48, infectados na década de 1990, em TARV por longo período e com carga viral de HIV indetectável ou no limite de detecção do teste empregado), foi detectada sensibilidade da XqPCR_*pol* de 58% e da XqPCR-*tax* de 52%, frente a 84% de sensibilidade do WB. Por outro lado, na casuística da rotina-IAL (n=104, infectados mais recentemente e muitos ainda sem TARV), a sensibilidade do WB foi de 76%, e das XqPCRs_*pol* e XqPCR-*tax* de 70% e 67%, respectivamente. Soma-se a estes resultados os obtidos no Grupo 1 (n=39, sem a infecção pelo HIV), que apresentou sensibilidade de 97% para os testes moleculares, semelhante a capacidade de detecção do WB (100%). Os resultados do Grupo 1 concordam com os encontrados por Andrade et al., 2010 em doadores de banco de sangue, cuja sensibilidade foi de 99,4%, e ressaltam a maior sensibilidade dos testes moleculares em populações “imunocompetentes”, onde teoricamente a sensibilidade dos testes moleculares se aproxima dos 100%.

Ainda, os resultados obtidos mostram que as XqPCR HTLV conseguiram definir mais de 40% dos casos de WB indeterminados, cujo perfil é prevalente em população dos trópicos e é preocupante em bancos de sangue (Gessain e Cassar, 2012). Segundo Garin et al., 1994, em áreas endêmicas de infecção por HTLV o emprego da PCR poderia definir o diagnóstico das amostras com perfil indeterminado à análise pelo WB. Também nos casos de HTLV não tipados pelo WB e/ou LIA, a definição do diagnóstico é extremamente importante para prever o curso da infecção, principalmente em população infectada pelo HIV (Brites et al., 2009), defendendo então o emprego da XqPCR como primeiro teste confirmatório no algoritmo laboratorial de diagnóstico de infecção por HTLV-1/2.

À semelhança das explicações dadas para a baixa sensibilidade dos testes moleculares, as explicações dadas para os resultados de WB indeterminados e/ou HTLV não tipados são: baixa CPV de HTLV, presença de

partículas virais defectivas, fase de soroconversão, reatividade cruzada com outros retrovírus ou microrganismos, mutações em genes virais estruturais, baixa sensibilidade do *kit* de WB para detectar principalmente HTLV-2, entre outros (Garin et al., 1994; Santos et al., 2003; Vitone et al., 2006; Berini et al., 2007; Morimoto et al., 2007; Jacob et al., 2008; Waters et al., 2008; Costa e Segurado, 2009; Martins et al., 2010; Olah et al., 2010; Costa et al., 2011; Zanjani et al., 2011; Cánepa et al., 2015; Campos et al., 2017; Kuramitsu et al., 2017). De fato, o LIA mostrou melhores resultados em relação ao outro teste confirmatório sorológico (WB), porém permanece por ser determinado se isto se deve a menor critério de estringência na análise dos resultados do LIA (Campos et al., 2017).

Outro fato interessante neste estudo foi a maior frequência (90%) de HTLV-2 entre as amostras com perfil WB indeterminado, tal qual reportado anteriormente por Caterino-de-Araujo et al. (1998). Estes pesquisadores confirmaram pela PCR infecção por HTLV-2 em 25% das amostras de sangue com perfil WB indeterminado obtidas de pacientes com HIV/aids de São Paulo, contrapondo-se aos resultados obtidos por Garin et al. (1994), que identificaram 15% de positividade para HTLV-1 e nenhuma positividade para HTLV-2, em amostras WB indeterminadas, no Zaire. Apesar de estes resultados aparentarem discordância, deve-se levar em consideração a região geográfica e as populações de estudo: no Zaire prevalece a infecção por HTLV-1 e o estudo foi realizado com amostras de banco de sangue, enquanto em São Paulo circulam tanto o HTLV-1 como o HTLV-2 e a população era de pacientes com HIV/aids. De todo modo, vale lembrar que as XqPCR do presente estudo se mostraram eficientes em solucionar mais de 40% dos casos WB indeterminados (maioria HTLV-2), e com maior sensibilidade para o gene *pol* em relação ao *tax*.

Posto que a infecção pelo HTLV-2 é de grande importância como marcador de valor prognóstico na infecção por HIV (Beilke, 2012), e que sua detecção é mais difícil devido à baixa CPV e ao uso constante de medicação do

paciente soropositivo (Montanheiro et al., 2008), qualquer técnica que melhore seu diagnóstico se faz necessária.

Outro fator que pode resultar em perfil WB indeterminado é a fase de soroconversão, segundo documentado por Jacob et al. (2008) e Costa et al. (2011). Isto pode ter sido a causa da baixa sensibilidade do WB nos pacientes da rotina diagnóstica do IAL do Grupo 2. Pelos dados das fichas de requisição de exames e idade dos pacientes, muitos tinham infecção recente pelo HIV, não podendo ser excluída a aquisição conjunta e recente do HTLV e, portanto, fase de soroconversão. De fato, neste grupo de pacientes, a sensibilidade do WB e das XqPCR_*pol* e XqPCR_*tax* foram semelhantes (76% versus 70% e 67%, respectivamente).

Kuramitsu et al. (2017), sugeriram que resultados de WB indeterminados poderiam ocorrer devido à baixa CPV ou a presença de partículas defectivas que diminuiriam ou alterariam a produção de anticorpos específicos. Buscaram por explicações ou mecanismos que justificassem os resultados WB indeterminados na infecção por HTLV-1. Utilizaram para as análises uma qPCR e o sequenciamento do genoma proviral completo do HTLV-1 com leitura em ambos os sentidos, senso e anti-senso. Encontraram alterações de nucleotídeos responsáveis por terminações prematuras (*stop códons*) com produção de proteínas menores. A maioria das trocas se deu de G para A no dinucleotídeo GG (64%), sugerindo serem mediadas pela APOBEC3G (enzima citidina deaminase, que altera o ácido nucleico viral), podendo resultar em pouca produção de anticorpos. Ainda, mostraram que nos casos WB indeterminados havia menor título de anticorpos detectados por quimioluminescência (CLIA) e menor CPV de HTLV-1 em relação aos pacientes que resultaram WB HTLV-1 positivos, corroborando resultados anteriores de Matsumoto et al. (1990). Este foi o primeiro estudo que comprovou a presença de mutações no DNA proviral (partículas provirais defectivas) como sendo responsável pela menor produção de anticorpos e menor CPV e, conseqüentemente, pelos resultados WB indeterminados.

Já para os HTLV não tipados pelo WB e/ou LIA, as XqPCR conseguiram discriminar HTLV-1 e HTLV-2 em 66,7% dos casos, cuja maioria foram de HTLV-1 (66,7%), com frequência semelhante para os alvos *pol* e *tax*.

Quando comparadas as sensibilidades das duas XqPCR do presente estudo, algumas considerações são necessárias. Curiosamente, partículas provirais defectivas de HTLV-1, principalmente na região 5' LTR e nas regiões *gag*, *pol* e *env*, foram descritas e relacionadas com a ATLL (Takenouchi et al., 2010), enquanto a presença de provírus completo ou presença da região *pX* com a HAM/TSP (Bezerra, 2011). Em portadores de HTLV-1, foram encontrados vírus defectivos principalmente na região *tax* (Bezerra, 2011). Ainda, alguns trabalhos descreveram menor CPV de HTLV-1 para a região *pol* e *gag* em relação à região *pX* e associação com polimorfismos na região *pol* e presença de partículas defectivas (Takenouchi et al., 2011; Ueno et al., 2012). Estas descrições dão certo suporte aos resultados discrepantes obtidos no presente estudo, quando as mesmas amostras de DNA foram analisadas pelas duas XqPCR HTLV, e os resultados foram discordantes. Nestes casos, não se pode excluir a possibilidade de existirem partículas provirais defectivas circulando nos pacientes e que interferem na sensibilidade dos testes.

Estas condições poderiam explicar o melhor desempenho, embora pequeno, encontrado na XqPCR_*pol* em relação XqPCR_*tax* nos casos infectados pelo HIV. Como a totalidade dos casos não apresentava sintomas de HAM/TSP (comunicação verbal durante acompanhamento dos pacientes do CRT/aids), os resultados corroboram a presença de partículas defectivas na região *tax*. Por outro lado, e também em relação ao gene *tax*, foi encontrada uma amostra com resultado discordante entre os ensaios de XqPCR_*pol*, WB e LIA em relação a XqPCR_*tax* (amostra 40, Quadro 12). Os três primeiros ensaios identificaram apenas o HTLV-2, enquanto a XqPCR_*tax* detectou repetidamente a dupla infecção HTLV-1 e HTLV-2. Infelizmente, por não se dispor de quantidade de DNA suficiente, não foi possível sequenciar o material para confirmar os resultados obtidos. No entanto, esta mesma amostra havia

resultado HTLV-1 positiva em estudo anterior, quando utilizada a PCR-RFLP *tax* (Campos et al., 2017). Se este achado significa apenas um segmento de *tax1* circulando no paciente, ou se foi devido à reação inespecífica das PCR *tax*, permanece por ser elucidado. No entanto, existe a possibilidade, embora rara, de pareamento dos *primers* em DNA humano (Adele Caterino de Araujo, comunicação pessoal). Esta questão só seria resolvida caso tivesse sido possível sequenciar os produtos de amplificação, o que não ocorreu.

As mesmas considerações feitas em relação à sensibilidade diagnóstica se aplicam à precisão diagnóstica das XqPCR HTLV. Esta pode ter sido prejudicada se considerado que pode ter havido pouca CPV no indivíduo infectado em uso de TARV, em caso de infecção por HTLV-2 e no sexo feminino, como descrito por Machuca e Soriano (2000), Montanheiro e colaboradores (2008) e Costa et al. (2011). De fato, no presente estudo, a quase totalidade das amostras de DNA testadas provinham de pacientes infectados pelo HIV/aids, muitos em TARV, e houve mais dificuldade em se detectar HTLV-2 pelas XqPCR. Digno de nota, não foi encontrado resultado falso positivo no presente estudo. Ainda, merece destaque que muitos fatores podem interferir no resultado do ensaio, como inibidores presentes na amostra, qualidade do DNA extraído, quantidade de DNA proviral inferior ao LMD do teste, entre outros (Yang e Rothman, 2004).

Quanto a outros parâmetros de validação das XqPCR HTLV em amostras clínicas, houve ótima reprodutibilidade e precisão dos resultados obtidos com as duas reações.

Em relação aos ensaios padronizados no formato *multiplex*, vários estudos foram realizados, porém nenhum deles possibilitou sua utilização para os três analitos usando diferentes plataformas e reagentes, como ocorreu no presente estudo. Por exemplo, Moens et al. (2009) desenvolveram uma qPCR *triplex* aplicável na plataforma ABI, capaz de detectar 1 cópia de HTLV-1, HTLV-2, STLV-3 e gene de referência separadamente. Lee et al. (2004) padronizaram um ensaio qPCR *duplex* aplicável em diferentes plataformas, com

a mesma sensibilidade detectada no presente estudo, porém sem distinguir HTLV-1 de HTLV-2, pois empregou um par de *primers* capaz de parear com ambos os tipos virais; ainda, para a detecção do produto amplificado, utilizaram um corante de DNA. Outro ensaio de qPCR *duplex* que detectava HTLV-1/2 com LMD de 60 cópias foi descrito por Estes e Sevall (2003). Besson e Kazanji (2009) padronizaram uma qPCR *quadriplex* (HTLV-1, HTLV-2, STLV-3 e albumina) com LMD de 1 cópia para HTLV-1 e 10 cópias para HTLV-2, e utilizaram ROX como sonda, excluindo reagentes que contem referencia passiva e limitando o uso da plataforma ABI. Já Waters et al. (2011) descreveram um ensaio qPCR *triplex* (HTLV-1, HTLV-2 e Albumina) com sensibilidade de 1-10 cópias para todos os genes-alvo, aplicável apenas na plataforma ABI. Portanto, as XqPCR deste estudo levam vantagem em relação as descritas até o momento, ressaltando que as plataformas usadas apresentam filtros e *softwares* que representam todas as plataformas disponíveis no comércio.

Quanto aos valores elevados de Cq detectados neste estudo, e que diferem de outros, estes podem ter decorrido da pouca CPV presente nas células dos infectados e que pode estar relacionada ao tipo viral (HTLV-2, por exemplo) segundo Montanheiro et al. (2008) e Waters et al. (2011), ou ao genótipo viral e ao modo de aquisição da infecção viral, como relatado por Murphy e colaboradores (2004). Ainda, pode estar relacionado com linfopenia presente nos pacientes com HIV/aids, pois a maioria dos ensaios foi realizada com PBL, apenas quando se pensou em determinar CPV é que foram separadas CMNs.

Em relação à aplicação das XqPCR HTLV no acompanhamento dos infectados, muitos artigos relataram que o aumento de CPV é um marcador de progressão da infecção/doença (Altamiro et al., 2010; Takenouchi et al., 2011; Waters et al., 2011; Castro et al., 2013; entre outros). Com o escopo de avaliar se a XqPCR *pol* poderia ser usada como marcador de valor prognóstico neste estudo, foi possível sua aplicação com resultados promissores em 12 das 16

amostras de CMNs coletadas. Infelizmente, não foi possível validar a técnica para esta finalidade, devido aos motivos expostos anteriormente. No entanto, cabe salientar que o emprego de diferentes genes alvos (*pol X tax*), com cinéticas e eficiências mesmo que similares, não implicam num mesmo resultado de quantificação, principalmente para o HTLV, cuja presença de partículas defectivas ou deleções de determinado gene, podem alterar a CPV avaliada (Takenouchi et al., 2011).

Os resultados do presente estudo mostraram que as sensibilidades diagnóstica das XqPCR podem se assemelhar, mas não suplantam as do WB, necessitando do complemento deste ou de outro ensaio, como o LIA, fato este também reportado por outros autores e bem documentado por Campos et al., 2017; todos em busca do melhor algoritmo de diagnóstico do HTLV, como por exemplo Ishihara (2014), que propôs o emprego da qPCR seguida da nPCR para concluir o diagnóstico de infecção pelo HTLV.

Uma alternativa molecular promissora é a dPCR, que apresenta maior sensibilidade com detecção e quantificação simultânea do DNA (1 cópia), sem a necessidade de uma curva padrão. Hedberg e colaboradores, padronizaram uma ddPCR (*droplet digital PCR*) tendo como alvo o gene *tax* e ao analisarem 52 amostras HTLV-1 positivas, 4 HTLV-2, 6 indeterminadas e 20 negativas a análise pelo LIA, detectaram pela qPCR 47/52 (90%) das HTLV-1, enquanto a ddPCR detectou 50/52 (96%) das HTLV-1 e 4/4 (100%) das HTLV-2. Em relação às amostras com perfil indeterminado, todas resultaram negativas na qPCR e na ddPCR, sugerindo inespecificidade da reação sorológica nestes casos. A análise de correlação de quantificação entre a qPCR e ddPCR resultou altamente concordante (Hedberg et al., 2018). Já Yurick e colaboradores, empregaram duas regiões como alvo (*gag* e *tax*) na padronização e validação de uma ddPCR para detectar e quantificar com precisão células T infectadas com o HTLV-1c. Foram utilizados na pesquisa PBMC, lavado broncoalveolar e escarro de aborígenes australianos que apresentavam bronquiectasia. A ddPCR conseguiu detectar HTLV-1c em

linfócitos T de lavado broncoalveolar, confirmando o HTLV-1c como responsável pela bronquiectasia. Portanto, estas técnicas são promissoras, principalmente para pesquisa em material biológico com baixa CPV e de difícil obtenção.

Quanto ao custo dos exames de XqPCR HTLV, não foi possível um cálculo do valor real, pois para tanto se deveria recorrer a empresas especializadas, que conseguem dimensionar todas as etapas e despesas envolvidas no processo desde a padronização, validação e execução dos testes.

Curiosamente, nos pregões eletrônicos quando há grande demanda de compra de alguns insumos, há redução no custo, e isto tem sido observado no IAL. Porém deve-se salientar que este custo sofre oscilação, de acordo com os valores do dólar comercial e situação econômica do país. De todo modo, considerando-se os valores dos insumos do ano de 2018, estimou-se os valores dos testes confirmatórios, mostrando que o valor dos testes de XqPCR foram 78% menores em relação ao WB e/ou LIA. Isto quando empregada extração manual de DNA.

Porém, sabe-se que em casos de coinfeção HIV/HTLV, os testes moleculares são menos sensíveis que os sorológicos, sendo necessário utilizá-los para confirmar infecção por HTLV-1, e principalmente por HTLV-2 (Campos et al., 2015, 2017). Assim, quando a XqPCR foi aplicada no algoritmo de testes laboratoriais de diagnóstico como o primeiro teste, seguido do LIA nas amostras negativas, houve uma redução de pelo menos 32,5% de custos do exame para o SUS; novamente destacando-se que isto ocorreu por conta de serem amostras de pacientes com a coinfeção HIV. No caso de indivíduos sem a infecção por HIV a redução de custos é de cerca de 70%.

Concluindo, como o objetivo principal do presente estudo foi padronizar um método de qPCR no formato *multiplex* para detecção simultânea de HTLV-1, HTLV-2 e gene de referência, para tentar resolver problemas relativos a custos, pouco volume e dificuldade em se obter amostras biológicas, além de

ser aplicável em diferentes plataformas e com reagentes distintos, foi possível padronizar e validar de acordo com a normas estabelecidas pelo IAL, duas XqPCR para serem usadas no diagnóstico confirmatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 e futuramente para monitorar CPV de HTLV-1/2 durante o seguimento dos infectados. Assim, os ensaios de XqPCR HTLV_*pol* e XqPCR HTLV_*tax* podem fazer parte do rol de exames oferecidos pelo IAL à rede pública de saúde.

Finalmente, mais uma vez o IAL cumpriu o seu papel: desenvolver estudos e metodologias também para doenças negligenciadas no Brasil e no mundo. Estas metodologias fizeram parte do Programa de Aceleração e de Inovação Tecnológica da SES/SP no IAL, Projeto SPUK: Inovação aberta em Saúde, em parceria entre o Governo do Estado de São Paulo (Secretarias da Saúde e de Desenvolvimento Econômico) e o Governo do Reino Unido (Decreto No 62.016/16), e se encontram em sigilo para Transferência de Tecnologia.

6. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- (i) Volume limitado de amostra biológica
- (ii) Baixa carga proviral em pacientes infectados pelo HIV
- (iii) Quantidade e volume insuficiente de amostras para validação da quantificação de carga proviral, empregando os dois genes alvos (*pol* e *tax*).
- (iv) Ausência de amostras soronegativas para HIV e positivas para o HTLV-2.

7. CONCLUSÃO

Foi possível padronizar e validar duas XqPCR HTLV ou qPCR HTLV *multiplex* para os alvos *pol* e *tax* que se mostraram específicas e úteis para a detecção de HTLV-1/HTLV-2 além do gene da albumina humana, e que poderão ser introduzidas no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV, usando diferentes plataformas e marcas de reagentes para PCR em tempo real. Ainda, a XqPCR HTLV_*pol* se mostrou uma técnica promissora para o o monitoramento de CPV de HTLV-1/2 nos infectados.

As XqPCR HTLV padronizadas e validadas poderão contribuir para a diminuição de custo dos exames de diagnóstico confirmatório de HTLV-1/-2, tempo de trabalho e material biológico (DNA) extraído, sendo mais uma opção para os laboratórios de saúde pública do país.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad-Fernández M, Cabrera C, García E, Vallejo A. Transient increment of HTLV-2 proviral load in HIV-1-co-infected patients during treatment intensification with raltegravir. *J Clin Virol.* 2014; 59:204–207.

Alves FA. Prevalência de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) e vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) em população infectada pelos vírus da hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV). Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC, Caterino-de-Araujo A. Hepatitis C viral load in HCV-mono and HCV/HIV-1, HCV/HTLV-1/-2, and/or HCV/HIV/HTLV-1/-2 coi-infected patients from São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22(2): 123-128.

Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MSS, Silva SMN, Basques FV, Ribas JG, et al. Análise do uso da PCR em tempo real para HTLV-1 e 2 como teste confirmatório na triagem de doadores de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo.* 2010; 43(2): 111-115.

Applied Biosystems. Kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Protocol Foster City, CA, USA, 2002; capítulo 2(2-6). Disponível em: www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/cms_040026.pdf. [Data de acesso: 19/01/2010].

Applied Biosystems. Real Time PCR Handbook, Life Technologies - ABI. (material exclusivo de curso de formação da ABI).

Arruda BC, Lira RA, Loureiro P, Brandão L, Souza P, Souza WV et al. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in patients in the Hematologia da Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008; 30(5): 384-389.

Assone T, Paiva A, Fonseca LAM, Casseb J. Genetic markers of the host in persons living with HTLV-1, HIV and HCV infections. *Viruses.* 2016; 8(2):38. doi:10.3390/v8020038

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

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983; 220:868-871.

Beilke MA. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. *AIDS Res Human Retrovir.* 2012; 28(2): 139-147.

Berini CA, Eirin ME, Delfino CM, Weissenbacher M, Biglione MM. Predominance of human lymphotropic T cell virus type 2 subtype b in urban populations of Argentina. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2012; 28(9):1102-1109.

Berini CA, Eirin ME, Pando MA, Biglione MM. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *J Med Virol.* 2007; 79:69-73.

Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation and quantification of human T-cell leukaemia viruses types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4):1129-1135.

Best I, Adauí V, Verdonck K, González E, Tipismana M, Clark D, et al. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146:226-233.

Bezerra ACS. Identificação do provírus defeituoso e classificação da sequência tax do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/ mielopatia (PET/MAH) e doadores de sangue (tese de Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. 193p

BioRad Laboratories Inc. Reagent Comparison Guide for Real-Time PCR, 2013.

Biswas HH, Kaidarova Z, Garratty G, Gibble JW, Newman BH, Smith JW et al. Increased all-cause and cancer mortality in HTLV-II infection. *J Acquir Imm Defic Syndr*. 2010; 54(3): 290-296.

Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília. 2014; 416p.

Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV AIDS. Brasília. 2018; 49 (53):1-61.

Brasil - Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003- D.O.U. 29/06/2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Acesso 20.06.2018. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm

Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Guia do manejo clínico do HTLV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 52 p.: II: – (Série A. Normas e Manuais

Técnicos) – (Série Manuais; n.º 3 – CN-DST e Aids). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_manejo_clinico_do_pacient_e_com_HTLV.pdf

Brites C, Alencar R, Gusmão R, Pedroso C, Pedral-Sampaio D, Badaró R, et al. Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS*. 2001; 15:2053-2055.

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

Broeders S, Huberb I, Grohmann L, Berbend G, Tavernierse I, Mazzaraf M, et al. I. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*. 2014; 37(2):115-126. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>

Burd ME. Validation of laboratory developed molecular assay for infectious diseases. *Clin Microbiol Reviews*. 2010; 23(3):550-576.

Cabral F, Arrudac LB, Araújo ML, Montanheiro P, Smid J, Oliveira ACP, et al. Detection of human T-cell lymphotropic virus type 1 in plasma samples. *Vir Res*. 2012; 163:87-90.

Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 2005; 2:1-4.

Campos K R, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Costa NA, Barreto-Damião CH, Magri MC, et al. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2015; 74:57-65.

Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, 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). *Braz J Infect Dis.* 2017; 21(3):297-305.

Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, Biglione M. Low proviral load is associated with indeterminate Western Blot patterns in human T-cell lymphotropic virus type 1 infected individuals: could punctual mutations be related? *Viruses.* 2015; 7(11):5643-5658.

Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Martins-Filho AO, et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop S. Paulo.* 2002; 35(5):499-508.

Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Hisada M, et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.* 2006; 19(1):44-53.

Carneiro-Proietti ABF. HTLV *Cadernos Hemominas.* Fundação Hemominas, Belo Horizonte. 2015; 16: 651p

Caskey MF, Morgan DJ, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Orge GO, et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2007; 23(3):365-371.

Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. *AIDS Rev.* 2007; 9(3):140-9.

Casseb J, Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LMI, Olah I, Smid J, et al. T CD4+ cells count among patients co-infected with human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis / HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Rev Inst Med trop S. Paulo.* 2007; 49(4):231-233.

Casseb J, Souza T, Pierre-Lima MT, Yeh E, Hendry RM, Gallo D. Testing problems in diagnosing HTLV infection among intravenous drug users with AIDS in São Paulo city, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1997; 13(18):1639-1641.

Castro GM, Balangero MC, Maturano E, Mangeaud A, Gallego SV. Development and validation of a real-time PCR assay for a novel HTLV-1 tax sequence detection and proviral load quantitation. *J Virol Methods.* 2013; 189: 383-387.

Castro-Costa CM, Carton H, Santos TJT. HTLV-I negative tropical spastic paraparesis. A scientific challenge. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001; 59(2-A):289-294.

Castro E, Roger E. Hepatitis C virus/human T lymphotropic virus 1/2 coinfection: regional burden and virological outcomes in people who inject drugs. *World J Virol.* 2016; 5(2):68-72.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2005; 21(3):926-931.

Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods.* 2009a; 156:150-151.

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

Caterino-de-Araujo A. 10 de Novembro - Dia Mundial do HTLV. *BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista* 2018; 15(179):27-30.

Caterino-de-Araujo A, Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC. Making the invisible visible: searching for human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Brazilian patients with viral hepatitis B and C. *Mem Inst Oswaldo Cruz, R. Janeiro*. 2018; 113(2):130-134.

Caterino-de-Araujo A, Sacchi CT, Gonçalves MG, Campos KR, Magri MC, Alencar WK, and the Group of Surveillance and Diagnosis of HTLV of São Paulo (GSuDiHTLV-SP). Current prevalence and risk factors associated with HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Human Retrovir*. 2015; 31(5):543-549.

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Zandoná-Meleiro MC, Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, et al. Sensitivity of two ELISA tests in relation to western blot in detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(3):173-182.

CDC – Centers for disease control and prevention. Current trends licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. *MMWR - Morb Mortal Wkly Rep*. 1988; 37(48):736-740.

CDC – Centers for disease control and prevention. Current trends human T lymphotropic virus type I screening in volunteer blood donors – United States, 1989. *MMWR - Morb. Mortal Wkly Rep*. 1990; 39(50):915, 921-924.

Césaire R, Dehée A, Lézin A, Désiré N, Bourdonné O, Dantin F, et al. Quantification of HTLV type I and HIV type 1 DNA load in coinfecting patients: HIV type 1 infection does not alter HTLV type I proviral amount in the peripheral blood compartment. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2001; 17(9):799-805.

Ciminale V, Rende F, Bertazzoni U, Romanelli MG. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. *Front. Microbiol*. 2014; 5:398| <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00398>.

Colin DD, Alcântara LCJ, Santos FLN, Uchôa R, Tavares-Neto J. Seroprevalence of human T cell lymphotropic virus infection and associated factors of risk in blood donors of Rio Branco city, AC, Brazil (1998-2001). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(6):677-683.

Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV) Taxonomy - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.

Cook L, Melamed A, Yaguchi H and Bangham CRM. The impact of HTLV-1 on the cellular genome. *Curr Opin Virol*. 2017; 26:125-131.

Cook LB, Fuji S, Hermine O, Bazarbachi A, Ramos JC, Ratner L, Horwitz S, Fields P, Tanase A, Bumbea H, Cwynarski K, Taylor G, Waldmann TA, Bittencourt A, Marcais A, Suarez F, Sibon D, Phillips A, Lunning M, Farid R, Imaizumi Y, Choi I, Ishida T, Ishitsuka K, Fukushima T, Uchimar K, Takaori-Kondo A, Tokura Y, Utsunomiya A, Matsuoka M, Tsukasaki K, Watanabe T. Revised Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma International Consensus Meeting Report. *J Clin Oncol*. 2019 Mar 10;37(8):677-687. doi: 10.1200/JCO.18.00501. Epub 2019 Jan 18.

Costa CA, Furtado KCYO, Ferreira LSCF, Almeida DS, Linhares AC, Ishak R, et al. Familial transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(6):e2272. doi:10.1371/journal.pntd.0002272

Costa EAS. Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção para o HTLV-1 e HTLV-2 [dissertação]. São Paulo (SP). Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria da Saude, 2010. 101pp.

Costa EAS, Magri MC, 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. *J Virol Methods*. 2011; 173:280-283.

Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 44:185-189.

Costa JMP, Sumita LM, Segurado AC. Non-radioisotope detection of pol sequences of HTLV-1 proviral DNA: Standardization and sensitivity analysis. *J Virol Methods*. 2006; 137:29-33.

Dal Fabbro MMFJ, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas GMB, et al. Infecção pelo HTLV 1/2: atuação no pré-natal como estratégia de controle da doença no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop S. Paulo*. 2008; 41(2):148-151.

Da Silva Brito V, Santos FLN, Gonçalves NLS, Araujo TH, Nascimento DSV, Pereira FM, et al. Performance of commercially available serological screening tests for human T-cell lymphotropic virus infection in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(12):e00961-18 <https://doi:10.1128/JCM.00961-18>.

De-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, et al. HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol.* 1994; 10:165-171.

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

De Oliveira EH, Oliveira-Filho AB, Souza LA, Silva LV, Ishak MOG, Ishak R, et al. Human T-cell lymphotropic virus in patients infected with HIV-1: molecular epidemiology and risk factors for transmission in Piauí, Northeastern Brazil. *Curr HIV Res.* 2012, 10(8):700-707.

Dezzutti CS, Guenther PC, Daniel S, Utz U, Cabrera T, Marshall JH, et al. Detection of human T-lymphotropic virus (HTLV) tax sequences in New York City blood donors seronegative for HTLV types 1 and 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Jul;10(4):715-7.

Dutartre H, Clavière M, Journo C, Mahieux R. Cell-free versus cell-to-cell infection by human immunodeficiency virus type 1 and human T-lymphotropic virus type 1: exploring the link among viral source, viral trafficking, and viral replication. *J Virol.* 2016; 90:7607–7617.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(1):165-256.

Estes MC, Sevall JS. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV I or II. *Mol Cell Probes.* 2003; 17:59-68.

Furtado MSBS, Andrade RG, Romanelli LCF, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB. 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. *J Med Virol.* 2012; 84:664-671.

Furuta R, Yasunaga J-i, Miura M, Sugata K, Saito A, Akari H, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11):e1006722. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006722>

Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human retrovirus: from transmission to therapeutic treatment. *Virus.* 2018; 10(1):1. doi:10.3390/v10010001.

Galetto LR, Lunge VR, Béria JU, Tietzmann DC, Stein AT, Simon D. Prevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus infection in Southern Brazilian HIV-positive patients. *AIDS Res Hum Retrovir.* 2014; 30(9):907-911.

Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sem L, Medeot S. Usefulness of a nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. *Mem Inst Oswaldo Cruz, R. Janeiro.* 2004; 99(4):377-380.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 1984; 224: 500-503.

Gallo D, Diggs JL, Hanson CV. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus western blot (immunoblot) kits with problems specimens. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(9): 2046-2049.

Garin B, Gosselin S, de The G, Gessain A. HTLV-I/II infection in a high viral endemic area of Zaire, Central Africa: comparative evaluation of serology, PCR, and significance of indeterminate Western Blot pattern. *J Med Virol.* 1994; 44:104-109.

Gascón MR, Capitão CG, Nogueira-Martins MC, Casseb J, Penalva Oliveira AC. The Influence of Coinfection on Mood States in HTLV-1-Infected Patients. *ISRN Psychiatry.* 2012; 1:325864. doi: 10.5402/2012/325864

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985; 2:407-410.

Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol.* 2012; 3:388. doi:10.3389/fmicb.2012.00388

Gross C, Thoma-Kress AK. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. *Viruses.* 2016, 8:74. doi:10.3390/v8030074

Guimarães de Souza V, Martins ML, Carneiro-Proietti ABF, Januário JN, Ladeira RVP, Silva CMS, et al. High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(2):159-162.

Hedberg ST, Eriksson L, Demontis MA, Mölling P, Sundqvist M, Taylor G, et al. Droplet digital PCR for absolute quantification of proviral load of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) types 1 and 2. *J Virol Methods* 2018; 260:70-74

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1605-1607.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993, 11(9):1026-1030.

Hisada M, Chatterjee N, Zhang M, Battjes RJ, Goedert JJ. Increased hepatitis C virus load among injection drug users infected with human immunodeficiency virus and human T lymphotropic virus type II. *J Infect Dis*. 2003;188:891-897.

IRVA - International Retrovirology Association guidelines for the management of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, 2018. p.22. Disponível em: <https://htlv.net/HAMguidelines>. [Data de acesso: 20/05/2019]

Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Vicente ACP, Hall WW, Ishak MOG. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect*. 2007; 135:604-609.

Ishihara K, Inokuchi N, Tsushima Y, Tsuruda K, Morinaga Y, Hasegawa H, et al. Relevance of molecular tests for htlv-1 infection as confirmatory tests after the first sero-screening. *J Immunoassay Immunoch*. 2014; 35(1):74-82.

Jacob F. Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2007. 108 pp.

Jacob F, Santos-Fortuna, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*. 2007; 49(6): 361-364.

Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, 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 J Clin Virol. 2008; 42(2):149-155.

Joint United Nations Program on HIV/AIDS - UNAIDS. 2017. Disponível em: https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2017/12/UNAIDSBR_FactSheet.pdf [acesso em 13 dez 2017].

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science. 1982; 218: 571-573.

Kamihira S, Dateki N, Sugahara K, Hayashi T, Harasawa H, Minami S, et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. Clin Lab Haem. 2003; 25:111-117.

Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, et al. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: A multi-center study. Cancer Sci. 2010; 101: 2361-2367.

Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, Sasaki D, et al. Proviral features of human T cell leukemia virus type 1 in carriers with indeterminate Western blot analysis results. J Clin Microbiol. 2017; 55:2838-2849.

Kuramitsu M, Okuma K, Nakashima M, Sato T, Sasaki D, Hasegawa H, et al. Development of reference material with assigned value for human T-cell leukemia virus type 1 quantitative PCR in Japan. Microbiol Immunol. 2018; 62:673-676. doi:10.1111/1348-0421.12644

Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MAV, Galvão-Castro B, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2006; 22(10): 953-959.

Lairmore MD., Michael B, Silverman L, Nair A. Human T-Lymphotropic Virus-Associated Neurological Disorders. In: Minagar A., Alexander J.S. (eds) *Inflammatory Disorders of the Nervous System. Current Clinical Neurology*. Humana Press; 2005; p.319-335. <https://doi.org/10.1385/1-59259-905-2:319>.

Lairmore MD, Haines R, Anupam R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr Opin Virol*. 2012; 2:474-481.

Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L, et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 371-376.

Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J Clin Virol*. 2004; 31: 275-282.

Literatura Geral/Manuais: Essentials of Real Time PCR (Applied Biosystems) e Roche LigthCycler®480. [Data de acesso 21/07/2010]. Disponíveis em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb/marketing/documents/generaldocuments/cms042485.pdf>

<http://www.roche-applied-science.com/publications/wbt.htm>

Liu H, Shah M, Stramer SL, Chen W, Weiblen BJ, Murphy EL. Sensitivity and specificity of human T-lymphotropic virus (HTLV) types I and II polymerase chain reaction and several serologic assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. *Transfusion*. 1999; 39:1185-1193.

Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp.2012; (63): e3998.

Machado Filho AC, Sardinha JFJ, Ponte RL, Costa EP, Silva SS, Martinez-Espinosa FE. Prevalence of infection for HIV, HTLV, HBV and of syphilis and chlamydia in pregnant women in a tertiary health unit in the western Brazilian Amazon region. Rev Bras Ginecol Obstet. 2010; 32(4):176-183.

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

Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sem L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. J Med Virol. 2004; 74: 323-327.

Marr I, Davies J, Baird RW. Hepatitis B virus and human T-cell lymphotropic virus type 1 co-infection in the Northern Territory, Australia. Int J Infect Dis. 2017; 58: 90-95.

Marras SA, Kramer FR, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. Nucleic Acids Res. 2002; 30 e122.

Marras SA. Interactive fluorophore and *quencher* pairs for labeling fluorescent nucleic acid hybridization probes. Mol Biotechnol. 2008; 38(3):247-255.

Martins ML, Santos AC, Namen-Lopes MS, Barbosa-Stancioli EF, Utsch DG, Carneiro-Proietti AB. Long-term serological follow up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. J Med Virol. 2010; 82:1746-1753.

Matsumoto C, Mitsunaga S, Oguchi T, Motomi Y, Shimada T, Ichigawa A, et al. Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method: comparison with HTLV-I antibody tests. *J Virol.* 1990; 64(11):5290-5294.

Matsuoka M, Yasunaga J-I. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol.* 2013, 3:684-691.

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

Moens B, López G, Adai V, González E, Kerremans L, Clark D, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3682–3691.

Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-II-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 28: 1643-1647.

Montanheiro P, Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Oliveira ACP, Kanzaki LIB, et al. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res.* 2008; 135: 22-25.

Moreira M, Ramos A, Netto EM e Brites C. Characteristics of co-infections by HCV and HBV among Brazilian patients infected by HIV-1 and/or HTLV-1. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17(6): 661-666.

Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, et al. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil. Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop S. Paulo.* 2007; 49(4):225-230.

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

Murphy EL, Lee T-H, Chafets D, Nass CC, Wang B, Loughlin K, et al. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. *J Infect Dis.* 2004; 190:504-510.

Nascimento LB, Carneiro MAS, Teles SA, Lopes CLR, Reis NRS, Costa e Silva AM, et al. Prevalence of infection due to HTLV-1 in remnant quilombos in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(6):657-660.

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

Neto WK, Da-Costa AC, de Oliveira ACS, Martinez VP, Nukui Y, Sabino EC, et al. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among Human T cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. *Virology.* 2011; 8:535. <http://www.virologyj.com/content/8/1/535>

Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Penalva de Oliveira AC, Duarte AJS, Casseb J. Neither molecular diversity of envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. *J Med Virol.* 2010; 82:837-842.

Olavarria VN, Gomes AN, Kruschewsky RA, Bernardo Galvão-Castro B, Grassi MFR. Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012; 16(4):357-360.

Olindo S, Lézin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Kaptue ME, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: A marker of disease progression. *J Neurol Sci.* 2005; 237:53-59.

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

Paiva A, Casseb J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (htlv-1) and type 2 (htlv-2) among indigenous populations in the américas. *Rev Inst Med Trop S. Paulo.* 2015; 57(1):1-13.

Paiva A, Smid J, Haziot MEJ, Assone T, Pinheiro S, Fonseca LAM, et al. High risk of heterosexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in Brazil. *J Med Virol.* 2017; 89:1287-1294.

Pimenta FCF, Haddad SK, Medeiros Filho JG, Costa MJC, Diniz MFM, Fernandes MP, et al. Prevalence ratio of HTLV-1 in nursing mothers from the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *J Hum Lact.* 2008; 24(3):289-292.

Poiesz BJ, Dube S, Choi D, Esteban E, Ferrer J, Leon-Ponte M, et al. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. *Transfusion*. 2000; 40: 924-930.

Poiesz B J, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:7415–7419.

Primo PJ, Siqueira I, Nascimento MCF, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res*. 2009; 42(8):761-764.

Rabenau FH, Kessler HH, Kortenbusch AS, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *J Clin Virol*. 2007; 40:93-98.

Rasmussen, R., Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications* Springer Press, Heidelberg; 2001; 21-34. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3

Real Time PCR Handbook, Life Technologies-ABI, Reagent Comparison Guide for Real-Time PCR, 2013 Bio-Rad Laboratories Inc.

Ribeiro MA, MD, Martins ML, Teixeira C, Ladeira R, Oliveira MF, Januário JH, et al. Blocking vertical transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 through breastfeeding interruption. *Pediatr Infect Dis J*. 2012; 31:1139-1143.

Rocha Júnior MC. Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na metodologia da PCR em tempo real. [Tese] Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2014.

Romanelli LCF, Ribeiro MA, Ferreira ASD, Gonçalves DU, Starling ALB, Martins ML, et al. Morbidity prevalence in HTLV-1 infected individuals with neurological follow-up in GIPH cohort. In: XIV Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2018. Belém, PA. E-poster.

Rosadas C, Cabral-Castro MJ, Vicente ACP, Peralta JM, Puccioni-Sohler M. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods*. 2013; 193: 536-541.

Ruiz-Mateos E, Ruiz-Léon MJ, Tarancón-Díez, Gutierrez C, Dronda F, Domínguez-Molina B, et al. High CD8 T cell percentage and HCV replication control are common features in HIV-1 controllers and HTLV-2-co-infected patients with a history of injection drug use. *Virus Res*. Available online 15 February 2019. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.02.007>

Sabino EC; Zrein M; Taborda CP; Otani MM; Ribeiro-dos-Santos G, Sáez-Alquézar A. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations *J Clin Microbiol*. 1999; 37(5):1324-1328.

Sambrook J, Russel DW. Agarose gel electrophoresis. In: *Molecular cloning: a laboratory manual* 3a Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001; Cap.7: 7.9-7.12 e 7.43-7.45.

Santos ACC, Soares DJ e Rivemales MCC. (Des) conhecimento, adoecimento e limitações impostas pelo HTLV: experiências de mulheres soropositivas. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro. 2017; 25 (1): 45-50.

Santos TJT, Costa CMC, Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J, Dooren SV, et al. Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7(3):202-209.

Segurado ACC, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge MLSSG, et al. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97:329-333.

Silva DPA. INNO-LIA como testes confirmatórios para infecção pelos vírus HTLV-1/2, uma boa escolha? [Monografia] Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo. 2011. 61p.

Soldan SS, Graf MD, Waziri A, Flerlage AN, Robinson SM, Kawanishi T, et al. HTLV-I/II seroindeterminate Western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. *J Infect Dis.* 1999; 180:685-694.

Souza LA, Lopes IGL, Maia EL, Azevedo VN, Machado LFA, Ishak MOG, et al. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(5):504-506.

Souza VG, Martins ML, Carneiro-Proietti ABF, Januário JN, Ladeira RVP, Silva CMS, et al. High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(2):159-162.

Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubistat M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif.* 2015; 3:9-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>

Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, et al. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 2011; 128:1335-1343.

Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC, Lemos JAR. HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real time PCR. *Rev Soc Bras Med Tropical S Paulo*. 2006; 39: 548-552.

Tanaka A, Matsuoka M. HTLV-1 alters T cell for viral persistence and transmission. *Front. Microbiol*. 2018; 9:461. Doi:10.3389/fmicb.2018.00461.

Taylor GP. The human T-lymphotropic viruses: bench and bedside progress. *Vir Res*. 2001; 78:1-4.

The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments -*Clinical Chemistry* 55 (4): 611-622 (2009).

Tichopad A, Dzidic A, Pfaffl MW. Improving quantitative real-time RT-PCR reproducibility by boosting primer-linked amplification efficiency. *Biotechn Lett*. 2003, 24:2053-2056.

Ticona E, Huaman MA, Yanque O, Zunt JR. HIV and HTLV-1 coinfection: the need to initiate antiretroviral therapy. *J Internat Assoc Providers of AIDS Care*. 2013; 12(6) 373-374.

Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of "nested" PCR products. *J Virol Methods*. 1992; 40:163-173.

Tuomi JM, Voorbraak F, Jones DL e Ruijter JM. Bias in the Cq value observed with hydrolysis probe based quantitative PCR can be corrected with the estimated PCR efficiency value. *J Methods*. 2010; 50:313-322. doi:10.1016/j.ymeth.2010.02.003

Turci M, Pilotti E, Ronzi P, Magnani G, Boschini A, Parisi SG, et al. Coinfection with HIV-1 and human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 2006; 41(1):100-106.

Ueno S, Umeki K, Nagatomo Y, Nagatomo Y, Kusumoto N, Umekita K et al. Proviral loads of human T-lymphotropic virus type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. *Int J Cancer.* 2012; 130:2318-26.

Vallejo A, Garcia-Saiz A. Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: application to clinical specimens. *J Virol Methods.* 1995; 51:9-18.

Vallinoto ACR, Muto NA, Pontes GS, Machado LFA, Azevedo VN, Santos SEB, et al. Serological and molecular evidence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. *Jpn J Infect Dis.* 2004; 57:156-159.

Vallinoto ACR, Pontes GS, Muto NA, Lopes IG, Machado LF, Azevedo VN, et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated afro-brazilian quilombo located in the Marajó island (Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101:103-105.

Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme A-M, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:266-281.

Vet JAM, Majithia AR, Marras SAE, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ, et al. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(11):6394-6399.

Vitone F, Gibellini D, Schiavone P, D'Antuono A, Gianni L, Bon I, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) prevalence and quantitative detection of DNA proviral load in individuals with indeterminate/positive serological results. *BMC Infect Dis.* 2006; 6:41. doi:10.1186/1471-2334-6-41.

Vrieling H, Zaaijer HL, Cuypers HTM, van der Poel CL, Woerdeman M, Lelie PN, et al. Evaluation of a new HTLV-I/II polymerase chain reaction. *Vox Sang.* 1997; 72: 144-147.

Waters A, Oliveira ALA, Coughlan S, Venecia C, Schor D, Leite A-C, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *J Clin Virology.* 2011, 52: 38-44.

Willems L, Hasegawa H, Acola R, Bangham C, Bazarbachi A, Bertazzoni U, et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: an agenda for research and action. *Antiviral Res.* 2017; 137:41-48.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(22):7994-7999.

Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology.* 2005, 2:4. doi:10.1186/1742-4690-2-4.

Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *Lancet.* 2004; 4:337-348.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79:2031-2035.

Yurick D, Khoury G, Clememns B, Loh L, Pham H, Kedzierska K, et al. Multiplex droplet digital PCR assay for quantification of human T-cell leukemia virus type 1 subtype c DNA proviral load and T cells from blood and respiratory exudates sampled in a remote setting. *J Clin Microbiol*. 2019; 57(2):e01063-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01063-18>.

Zanjani DS, Shahabi M, Talaei N, Afzalaghaee M, Tehranian F, Bazargani R. Molecular analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1/2) seroindeterminate blood donors from Northeast Iran: Evidence of proviral tax, env, and gag sequences. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2011; 27:131-135.

Zehender G, Ebranati E, Bernini F, De Maddalena C, Giambelli C, Collins J, et al. Phylogeny of human T cell lymphotropic virus type 1 in Peru: a high degree of evolutionary relatedness with South African isolates. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2007; 23(9):1146-1149.

9. ANEXO

9.1. Quadro 1.

Quadro 1. Publicações sobre o emprego de técnicas moleculares para o diagnóstico confirmatório e discriminatório, caracterização molecular e determinação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2.

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Matsumoto et al., 1990	Tokio, Japão	nPCR	<i>pX (tax)</i>		Diagnóstico de HTLV-1 e comparação com IF
Heneine et al., 1992	Atlanta, EUA	nPCR-hibridização líquida	<i>tax</i> HTLV-1 <i>pol</i> HTLV-2		Padronização diagnóstico confirmatório/discriminatório
Tuke et al., 1991	London, UK	nPCR-RFLP	<i>tax</i> HTLV-1 e -2 <i>TaqI</i> e <i>Sau3A</i>		Diagnóstico diferencial de HTLV-1 e HTLV-2
De-Araujo et al., 1994	S.Paulo (casos) Itália (teste)	nPCR-hibridização líquida	<i>tax/rex</i> HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório.
Garin et al., 1994	Zaire, África	nPCR-hibridização líquida, para HTLV-1 e HTLV-2	LTR, <i>pol</i> e <i>tax</i>	2 PCR+	Diagnóstico confirmatório e discriminatório. Uso em WB-Indeterminado
Vallejo e García-Sáiz, 1995	Madri, Espanha	nPCR-hibridização líquida, para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pol</i> <i>env</i>	1,5 pg MT2 e 5 pg Mo 1,5 pg MT2 e Mo	Padronização diagnóstico confirmatório/discriminatório
Vrielink et al., 1997	New Jersey, EUA	nPCR-hibridização e detecção por cor	<i>pol</i> HTLV-1/-2	Uso de painel para cálculo sensibilidade e especificidade	Padronização <i>kit</i> comercial para detectar HTLV-1/2 (Amplicor HTLV-I/II Roche)
Caterino-de-Araujo et al., 1998	S.Paulo (casos) Itália (teste)	nPCR para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> <i>env</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório.
Liu et al., 1999	San Francisco, EUA	nPCR-hibridização e detecção por cor (<i>kit</i> Roche)	<i>pol</i> HTLV-1/-2		Em população de risco como teste de triagem e confirmatório
Soldan et al., 1999	Washington, EUA	nPCR-hibridização líquida p/ HTLV-1 e -2 RT-PCR	LTR, <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>tax</i> , <i>env</i> <i>tax</i>		Para detectar HTLV-1/-e em amostras de sangue com WB-Indeterminado
Vet et al., 1999	New York, EUA	RT-PCR <i>multiplex</i> Beacon	<i>gag</i> HIV-1 <i>env</i> HIV-2 <i>tax</i> HTLV-1 <i>pol</i> HTLV-2 Plasmídeo (MR)	10 cópias de cada gene	Padronização diagnóstico confirmatório/discriminatório

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Poiesz et al., 2000	EUA, Paraguai, Argentina, Venezuela (casos) EUA (teste)	nPCR-hibridização para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pol</i> / HTLV-1 e HTLV-2	Melhor para HTLV-2	Diagnóstico confirmatório e para comparação com WB em população de UDI e indígenas
Castro-Costa et al., 2001	Ceará, Brasil	PCR nPCR	LTR, <i>tax</i> , <i>gag</i> <i>pol</i> , <i>env</i>		Diagnóstico confirmatório em casos de TSP HTLV- soronegativos
Césaire et al., 2001	Martinica (casos) França (teste)	qPCR TaqMan	<i>pol</i> / HTLV-1, albumina hu (CI)		Diagnóstico na coinfecção HIV/HTLV-1
Deheé et al., 2002	Martinica (casos) França (teste)	qPCR TaqMan	<i>pol</i> / HTLV-1, albumina hu (CI)	10 cópias	Determinação de CPV de HTLV-1 em HAM/TSP e portador assintomático
Segurado et al., 2002	São Paulo, Brasil	nPCR-RFLP HTLV- 1 e HTLV-2	<i>Tax</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Colin et al., 2003	Acre, Brasil	nPCR HTLV-1 e -2	<i>pol</i> / HTLV-1 e -2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em doadores de sangue com WB-Indeterminado
Estes e Sevall, 2003	EUA	qPCR <i>multiplex</i> HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> HTLV-1 LTR HTLV-2, beta-globina hu (CI) MT2 e Mo (MR)	48 cópias	Diagnóstico confirmatório e CPV em pacientes de ambatório de HTLV
Kamihira et al., 2003	Nagasaki, Japão	qPCR HTLV-1	<i>tax</i> HTLV-1 beta-globina hu (CI) plasmídeo (MR)	301 cópias/10 ⁴ PBMC	Determinação de CPV de HTLV-1 em ATLL e portador assintomático
Santos et al., 2003	Ceará (casos) Bélgica (testes)	nPCR	<i>tax</i> HTLV-1 e -2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos WB-Indeterminado

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Gallego et al., 2004	Córdoba, Argentina	nPCR-RFLP	<i>tax</i> HTLV-1 e -2 <i>TaqI</i> e <i>Sau3A</i>	Mais sensível que a PCR-hibridização <i>pol</i> para HTLV-2	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e comparação com PCR-hibridização <i>pol</i>
Lee et al., 2004	San Francisco, EUA	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> MT2 <i>tax</i> Mo HLA-DQ (CI)	1.6 cópias/10 ⁴ HTLV-1 2.8 cópias/10 ⁴ HTLV-2	Para determinar CPV e relacionar com patogênese
Mangano et al., 2004	Buenos Aires, Argentina	nPCR nPCR-RFLP	<i>pol</i> e <i>env</i> <i>tax</i> beta-actina hu (CI)	2 PCR+	Diagnóstico confirmatório e discriminatório em doadores de sangue com WB-Indeterminado
Murphy et al., 2004	San Francisco, EUA	qPCR SybrGreen	<i>tax</i>		Para comparar CPV de HTLV-1 e HTLV-2, e de HTLV-2a e HTLV- 2b
Vallinoto et al., 2004	Pará, Brasil	nPCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pX</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e para caracterização molecular
Laurentino et al., 2005	Pará, Brasil	nPCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório
Montanheiro et al., 2005	São Paulo, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 albumina hu (CI) MT-2 (MR)	10 cópias/10 ⁴ PBMC	Determinação de CPV de HTLV-1 em HAM/TSP e portador assintomático
Olindo et al., 2005	Martinica	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1		Determinação de CPV de HTLV-1 e progressão para doença
Yakova et al., 2005	Martinica (casos) França (teste)	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 albumina hu (CI) plasmídeo e MT-2 (MR)		Determinação de CPV em doenças do tecido conectivo e casos de artrite reumatóide

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Best et al., 2006	Lima, Peru	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> HTLV-1 VER-3 (CI) Plasmídeo (MR)		Determinação de CPV de HTLV-1 em HAM/TSP e portador assintomático
Costa et al., 2006	São Paulo, Brasil	nPCR-hibridização líquida com ³² P e fosfatase alcalina	<i>pol</i>	120 pg DNA	Padronização de técnica enzimática e comparação com marcação radioativa
Kashima et al., 2006	SP e RJ, Brasil	PCR	<i>tax</i> e LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Souza et al., 2006	Pará, Brasil	nPCR-RFLP nPCR	<i>pX</i> LTR HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Tamegão-Lopes et al., 2006	Pará, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 e HTLV-2 Albumina hu (CI)	226 cópias/mm ³ de sangue	Determinação de CPV de HTLV-1
Vallinoto et al., 2006	Marajó, Brasil	nPCR-RFLP nPCR	<i>pX</i> LTR HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Vitone et al., 2006	Bolonha, Itália	qPCR SybrGreen	<i>pol</i> HTLV-1 beta-globina hu (CI) MT-2 (MR)	10 cópias	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e uso em WB-indeterminados
Berini et al., 2007	Buenos Aires, Argentina	nPCR PCR-RFLP	<i>pol</i> HTLV-1 e -2 <i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos WB-indeterminados
Casseb et al., 2007	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP	<i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório
Ishak et al., 2007	Pará, Brasil	PCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>px</i> e <i>env</i> <i>TaqI</i>		Diagnóstico em população indígena soronegativa na triagem e HTLV-2 positiva
Morimoto et al., 2007	Paraná, Brasil	nPCR para HTLV-1 e HTLV-2	LTR, <i>env</i> , <i>tax</i>	2 PCR+	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e uso em WB-indeterminados

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Pimenta et al., 2007	Paraíba, Brasil	nPCR	LTR, <i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório em lactantes
Zehender et al., 2007	Lima, Peru	nPCR-RFLP nPCR	<i>tax</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Arruda et al., 2008	Pernambuco, Brasil	qPCR SybrGreen	<i>pol</i> HTLV-1 <i>env/tax</i> HTLV-2 albumina hu (CI)	Sensibilidade qualitativa 87.9% e para CPV 100%	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e determinação de CPV de HTLV-1 e HTLV-2
Dal Fabro et al., 2008	Mato Grosso do Sul, Brasil	PCR-RFLP	<i>tax</i> <i>HinfI</i> (HTLV-1) <i>Aval</i> (HTLV-2)		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos com WB-indeterminado em gestantes
Montanheiro et al., 2008	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP e qPCR TaqMann para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> <i>pol</i>	10 cópias/10 ⁴ PBMC	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e CPV de casos de HTLV-2
Besson e Kazanji, 2009	Gabão (casos) França (teste)	qPCR <i>multiplex</i> Beacons	<i>tax</i> HTLV-1, -2, -3 <i>tax</i> STLV-1 e 3 MT4, C19, HTLV-3 (MR) albumina hu (CI)	1 a 10 cópias em pelo menos 100 células	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e CPV em países onde circulam estes vírus
Costa e Segurado, 2009	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP nPCR-hibridização c/ fosfatase alcalina	<i>tax</i> <i>pol</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos de WB-indeterminado
Moens et al., 2009	Peru, França, Bélgica	qPCR <i>triplex</i> Sybr Green	<i>tax</i> (HTLV-1, -2 e STLV-3) beta-globina hu (CI)		Padronização e validação de qPCR triplex para retrovírus e qPCR single para beta-globina
Nascimento et al., 2009	Goiás, Mato Grosso do Sul, Brasil	nPCR	<i>tax</i> e LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em quilombolas

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Primo et al., 2009	Bahia, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1		Determinação de CPV em HAM/TSP e dermatites
Andrade et al., 2010	Minas Gerais, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 e -2 MT2 e plasma (MR) Albumina hu (CI)	Sensibilidade 99,4% e 98,5% em relação ao WB	Diagnóstico confirmatório e discriminatório
Kamihira et al., 2010	Tokio, Japão	qPCR TaqMan	<i>tax</i> HTLV-1 RNase P, beta-globina, beta-actina, CD81 hu (CI) Linhagens e plasmídeo (MR)	Melhores resultados com plasmídeo como MR, mas necessita de CI	Ensaio de proficiência intra- e inter-laboratorial
Martins et al., 2010	Minas Gerais, Brasil	nPCR	<i>env</i> HTLV-1		Determinação de infecção durante soroconversão de longo tempo e diagnóstico confirmatório em casos WB-indeterminado
Olah et al., 2010	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP qPCR TaqMann para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> (<i>TaqI</i> e <i>Sau3A</i>) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2)		Diagnóstico confirmatório de HTLV-2 em casos de WB-Indeterminado e CPV de HTLV-2
Costa et al., 2011	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP nPCR qPCR TaqMan para HTLV-1 e -2	<i>tax</i> (<i>TaqI</i>) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2) albumina hu (CI)	Sensibilidade PCR 77,4% e q-PCR 79,25%	Diagnóstico confirmatório e discriminatório
Neto et al., 2011	São Paulo, Brasil	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> (HTLV-1)		Determinação de CPV de HTLV-1 e associação com mutação em TRE na LTR
Zanjani et al., 2011	Mashhad, Irã	PCR	<i>gag</i> , <i>tax</i> (HTLV-1) <i>pol</i> (HTLV)	2 PCR+ associado com maior DO no EIA e perfil rgp46-I, GD21, gp21	Diagnóstico confirmatório em casos WB-indeterminado

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Berini et al., 2012	Buenos Aires, Argentina	nPCR PCR-RFLP	<i>pol</i> <i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos de WB-indeterminado
Cabral et al., 2012	São Paulo, Brasil	qPCR TaqMan nPCR	<i>pol</i> HTLV-1 <i>tax</i> (HTLV-1)		Determinação de CPV de HTLV-1 em PBMC e RNA viral em plasma
Olavarria et al., 2012	Bahia, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 Albumina hu (CI)		Determinação de CPV de HTLV-1 na HAM/TSP e portador assintomático, estabilidade de CPV com o tempo
Furtado et al., 2012	Minas Gerais, Brasil	qPCR SybrGreen	<i>pol</i> (HTLV-1) Albumina hu (CI) MT2 (MR)	<i>Cutoff</i> para HAM/TSP 114 cópias/10 ⁴ PBMC, sensibilidade 78,2%	Determinação de CPV de HTLV-1 e curva ROC para risco de HAM/TSP
Oliveira et al., 2012	Piauí (casos) Pará (teste)	nPCR-RFLP nPCR	<i>pX</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório de HTLV-1 e HTLV-2 e caracterização molecular
Ribeiro et al., 2012	Minas Gerais, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol-alb</i> (HTLV-1) <i>pol</i> (HTLV-2)		Confirmação transmissão vertical de HTLV
Souza et al., 2012	Maranhão, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i>		Determinação de prevalência em gestantes
Costa et al., 2013	Pará, Brasil	PCR-RFLP	<i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório de HTLV-1 e HTLV-2
Castro et al., 2013	Córdoba, Argentina	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> (HTLV-1) albumina hu (CI) MT2 (MR)	3 cópias	Diagnóstico confirmatório e monitoramento de CPV de HTLV-1
Rosadas et al., 2013	Rio de Janeiro, Brasil	qPCR TaqMan	<i>Tax</i> (HTLV-1) beta-actina hu (CI)	1 cópia	Validação de qPCR HTLV-1

Cont. Quadro 1

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Abad-Fernández et al., 2014	Madri, Espanha	qPCR TaqMan	<i>Tax</i> (HTLV-2) GAPDH (CI) Plasmídeo (MR)	50 cópias/10 ⁶ PBMC	Determinar efeito de raltegravir na infecção por HTLV-2
Galetto et al., 2014	Rio Grande do Sul, Brasil	PCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pol</i>		Determinar prevalência de coinfeção HIV/HTLV
Ishihara et al., 2014	Nagasaki, Japão	qPCR e nqPCR	<i>pX</i> (HTLV-1) beta-globina hu(CI)		Teste confirmatório para HTLV-1 pós triagem pelo CLIA
Cánepa et al., 2015	Argentina	nPCR qPCR SybrGreen	<i>pol</i> , <i>tax</i> , LTR (HTLV-1) <i>pol</i> (HTLV-1) albumina hu (CI)		Teste confirmatório em WB-indeterminado e CPV baixa. Pesquisa de mutações pontuais em <i>tax</i> e LTR, caracterização filogenética.
Nasir et al., 2015	Nigéria, África	qPCR	<i>tax</i> HTLV-1		Diagnóstico confirmatório e CPV de HTLV-1
Paiva et al., 2016	São Paulo, Brasil	nPCR-RFLP qPCR TaqMan	<i>tax</i> <i>pol</i> (HTLV-1 e-2)		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e CPV de casais discordantes
Hedberg et al., 2018	Suécia	ddqPCR	<i>tax</i> (HTLV-1 e -2)		Padronização e validação de PCR digital para monitoramento de CPVfr HTLV-1 e HTLV-2
Kuramitsu et al., 2018	Japão	dqPCR	<i>pX</i> (HTLV-1) RNaseP	2,71 cópias/100cel	Padronização e validação de PCR digital para diagnóstico e monitoramento de CPV
Yurick et al., 2019	Austrália	ddqPCR	<i>gag</i> , <i>tax</i> (HTLV-1) RPP30		Diagnóstico de bronquiectasia associada ao HTLV-1c

Legenda: LTR, *gag*, *pol*, *env*, *px*, *tax*: regiões do genoma de HTLV; MR: material de referência; CI: controle interno de reação; MT2, MT4: linhagens infectadas por HTLV-1; Mo, C19: linhagens infectadas por HTLV-2; PBMC: células do sangue periférico; EIA: ensaio imunoenzimático; DO: densidade óptica; WB: Western blot; PCR: reação em cadeia da polimerase; nPCR: *nested*-PCR; PCR-RFLP: reação de PCR seguida de pesquisa de sítios de restrição enzimática; RT-PCR: PCR em tempo real; qPCR: PCR quantitativa ou em tempo real; dPCR: PCR digital; dqPCR: PCR em temporeal digital; ddPCR: PCR digital em gota; CPV: carga proviral; HAM/TSP: mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical; ATLL: leucemia/linfoma de células T do adulto; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; STLV: vírus linfotrópico de células T de símios.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11302512.0.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 187.709

Data da Relatoria: 17/01/2013

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

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

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

mg

estando o projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

SAO PAULO, 22 de Janeiro de 2013



Assinador por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Marcadores genéticos virais e do hospedeiro que podem influenciar o curso da infecção pelo HIV-1 e da coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 52493316.1.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.412.892

Apresentação do Projeto:

Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV-1, HTLV-2 e HIV-1) compartilham as mesmas vias de transmissão e têm potencial patogênico distinto. O HTLV-1 é responsável pela leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e pela paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM), já o HTLV-2 não está associado a um tipo particular de doença, embora algumas manifestações clínicas semelhantes à TSP/HAM tenham sido descritas. Já o HIV-1 é o responsável pela pandemia mundial de AIDS. Estes vírus podem infectar o mesmo indivíduo e a coinfeção pode tanto acelerar como retardar o desenvolvimento de doenças a eles relacionadas. Sabe-se que a coinfeção HIV-1/HTLV-1 pode acelerar o desenvolvimento da AIDS enquanto a coinfeção HIV/HTLV-2 pode prorrogar o surgimento da AIDS. Vários fatores genéticos dos vírus e do hospedeiro podem estar envolvidos na progressão destas infecções para doença. No presente projeto, pretende-se determinar a frequência de determinados marcadores genéticos de valor prognóstico na infecção HIV-1 e na coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2. Serão pesquisados: tropismo de HIV-1 (R5 e X4), deleção no gene que codifica o correceptor de HIV-1 CCR5 (32), mutação no receptor CCR2-V64I e

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

no ligante natural do receptor CXCR4 (SDF-1-3'A), além de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes que codificam as citocinas da resposta imune inata IL28B e IL17A e o perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 e de quimiocinas em pacientes do CRT DST/AIDS-SP. Ainda, serão investigadas partículas virais defectivas de HTLV-1 e HTLV-2, genótipos de proteínas transativadoras de HTLV-1 e HTLV-2 (Tax1 e Tax2) e determinada carga proviral(CPV) de HTLV-1 e HTLV-2. Os resultados obtidos poderão auxiliar no melhor acompanhamento e tratamento aos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Pesquisar marcadores imunológicos e virológicos de valor prognóstico na coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2 e determinar suas frequências usando plasma e ou células do sangue.

Objetivos Secundários

- Determinar tropismo HIV-1 por sequenciamento de parte do envelope viral.
- Pesquisar deleção (32) no gene que codifica o CCR5 por técnica de PCR.
- Pesquisar polimorfismos nos genes que codificam o CCR2 (CCR2-64I), SDF1 (SDF-1-3'A), IL28B e IL17A usando a técnica de PCR-RFLP.
- Quantificar por citometria de fluxo citocinas humanas do perfil Th1/Th2/Th17 e quimiocinas em plasma.
- Verificar se existem partículas provirais defectivas de HTLV-1 e HTLV-2 usando o sequenciamento das regiões 5' LTR, env e tax.
- Pesquisar genótipos de Tax1 e Tax2 de HTLV-1 e HTLV-2 por sequenciamento da região pX.
- Padronizar a qPCR tax para determinar CPV de HTLV-1 e HTLV-2 e comparar com a qPCR pol.
- Analisar os resultados obtidos na coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2 e relacionar com dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.
- Avaliar os mesmos marcadores e sua frequência em indivíduos infectados pelo HIV-1, com e sem tratamento antirretroviral, e controles sadios HIV-1 soronegativos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Mínimos, considerando que o material biológico já foi coletado após o consentimento formal do participante por meio do TCLE, está armazenado com responsabilidade e será gerenciado segundo as normativas vigentes.

Também, há a declaração da pesquisadora responsável de sigilo e confidencialidade com os dados

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

da pesquisa.

Benefícios

Aprimoramento de diagnóstico e em decorrência a melhoria de tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa séria com compromisso do conhecimento aprofundado da coinfeção por HTLV-1, HTLV-2 e HIV, e ainda, com possibilidade de melhoria da assistência dos indivíduos infectados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados e de acordo, a seguir.

1. Folha de rosto, assinada por Dra. Carmem Aparecida de Freitas Oliveira, Diretora Substituta do Instituto Adolfo Lutz (IAL), de 12/01/2016.

2. TCLE

No preenchimento do campo "Propõe dispensa do TCLE" no documento "PB Informações básicas do projeto" está respondido "Não".

Na análise ética entendeu-se que o TCLE do protocolo "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV" já contemplava este estudo atual.

A resposta deveria ser sim e apresentar a justificativa.

3. Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do IAL, corroborada pela diretoria geral da instituição, de 16/12/2015.

Neste documento consta o orçamento do projeto de pesquisa (valor estimado de R\$ 267.257,50) com a informação que este será apresentado às agências de fomento para financiamento.

4. Termo de responsabilidade e sigilo, assinado por Dra. Adele Caterino Araújo, pesquisadora responsável, de 07/10/2015.

5. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Lucila Okuyama Fukasawa, pesquisadora do Centro de Imunologia do IAL, de 16/09/2013.

A declaração faz referência ao protocolo de pesquisa "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV".

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

Este documento foi aceito em consideração ao seguimento dos trabalhos da pesquisadora na área de pesquisa deste protocolo, e por ser este estudo atual relacionado ao protocolo referenciado na declaração.

7. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Paula Ordonhez Rigato, pesquisadora do Centro de Imunologia do IAL, de 13/01/2016.

8. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Luana Portes Ozório Coelho, pesquisadora do Centro de Virologia do IAL, de 13/01/2016.

9. Declaração de sigilo e compromisso, assinada por Nadia Aparecida Costa, Biomédica no IAL, de 13/01/2016.

10. Declaração de sigilo e compromisso, assinada por Suélen Aparecida Teixeira, Bolsista de Iniciação Científica no IAL, de 13/01/2016.

11. Declaração de sigilo e compromisso, assinada por Débora Lima Duarte, Bolsista de Iniciação Científica no IAL, de 13/01/2016.

12. Normas de biorrepositório do material biológico humano oriundo do protocolo de pesquisa "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV", protocolo este aprovado do ponto de vista ético de acordo com a Resolução CNS 466/2012 em 22/01/2013, e sua Emenda aprovada em 18/10/2013, onde estavam previstas as etapas do protocolo em análise.

Estão descritos os procedimentos de guarda, preservação, gerenciamento e temporalidade do material biológico humano de acordo com a Resolução CNS 441/2011.

Documentos apresentados com apontamento de revisão, a seguir

13. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Maria Gisele Gonçalves, pesquisadora do Centro de Imunologia do IAL, de

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

20/06/2012.

14. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Cláudio Tavares Sacchi, pesquisador do Centro de Imunologia do IAL, de 20/06/2012.

15. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Luis Fernando de Macedo Brígido, pesquisador do Centro de Virologia do IAL, de 20/06/2012.

16. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Karoline Rodrigues Campos, aprimoranda do Centro de Imunologia do IAL, de 20/06/2012.

Os documentos de números 13, 14, 15 e 16 fazem referência ao protocolo de pesquisa "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV", e o sigilo e o compromisso baseiam-se em normativa revogada.

Devem ser substituídos.

Recomendações:

1. Em próxima edição do protocolo de pesquisa atualizar os documentos de declaração de sigilo e compromisso dos pesquisadores Lucila O. Fukasawa, Maria G. Gonçalves, Claudio T. Sacchi, Luis F. M. Brígido, e da aprimoranda Karoline R. Campos, e para esta última atualizar sua função/atividade no IAL.

2. TCLE

Refletir a análise ética deste documento e manifestar-se na próxima edição do protocolo de pesquisa.

Verificar a submissão na Plataforma Brasil do "TCLE rev 2 CEPIAL" de 23/09/2013.

3. No documento "PB informações básicas do projeto" há citação errônea da Resolução CNS 196/1996 já revogada, a qual deve ser substituída na próxima edição do protocolo de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As recomendações deste parecer devem ser consideradas anteriormente à execução da pesquisa

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

mesmo com o entendimento claro que não há impedimento ético.

Protocolo de pesquisa aprovado com recomendações, e em consonância com as diretrizes institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa, pela análise do conjunto dos documentos, foi considerado aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL na reunião ordinária de 21 de janeiro de 2016.

Em 17 de fevereiro de 2016, Dra. Adele Caterino Araújo, pesquisadora responsável, em reunião presencial com Luz Marina Trujillo, coordenadora do CEPIAL, definitivamente esclareceu que o protocolo de pesquisa atual contempla as etapas previstas e não realizadas do protocolo de pesquisa “Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV”, o qual por razão a declarar deverá ser encerrado após o envio do relatório final. Informou, também, que o material biológico humano armazenado foi colhido com consentimento individual para o propósito do estudo atual, e guarda todos os TCLEs assinados. Aproveitando o encontro, Dra. Adele Caterino Araújo tomou conhecimento de aspectos éticos da dispensa do TCLE e sua justificativa.

O protocolo de pesquisa “Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV” foi aprovado do ponto de vista ético em 22/01/2013, sua Emenda em 18/10/2013, suas Notificações de relatório parcial “1º Relatório Técnico” em 09/06/2014, e outro relatório parcial em 28/04/2015.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_651098.pdf	15/01/2016 12:03:51		Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_responsabilidade_e_sigilo_Adele.pdf	15/01/2016 12:03:17	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_SAT.pdf	13/01/2016 15:09:23	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_POR.pdf	13/01/2016 15:08:57	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_NAC.pdf	13/01/2016 15:08:26	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_LPOC.pdf	13/01/2016 15:08:04	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_LOF.pdf	13/01/2016 15:07:37	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_DLD.pdf	13/01/2016 15:07:08	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	encaminhamento_projeto.pdf	13/01/2016 15:06:17	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_assinada.pdf	13/01/2016 09:11:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	Questionario_2_prontuario.pdf	12/01/2016 11:30:38	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CTC_2013.pdf	12/01/2016 11:10:20	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	PARECER_CEP_28_05_2015.pdf	12/01/2016 11:09:32	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	Questionario_1_entrevista.pdf	12/01/2016 11:02:53	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_MGG.jpg	12/01/2016 10:59:09	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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

Continuação do Parecer: 1.412.892

Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_LB.pdf	12/01/2016 10:57:06	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_KRC.pdf	12/01/2016 10:56:34	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_CTS.jpg	12/01/2016 10:55:30	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_comprometimento_Adele.pdf	12/01/2016 10:54:23	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_DG.pdf	12/01/2016 10:52:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CTC.pdf	12/01/2016 10:52:02	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_Adele.pdf	12/01/2016 10:50:45	Adele Caterino de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2013.pdf	12/01/2016 10:48:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil_2016.pdf	12/01/2016 10:44:18	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 17 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

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