RAFAEL XAVIER DA SILVA

Avaliação do emprego de *pool* de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2

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

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Rafael Xavier da

Avaliação do emprego de *pool* de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2 / Rafael Xavier da Silva. – 2020.

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, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo.

1. Vírus linfotrópico T tipo 1 humano. 2. Vírus linfotrópico T tipo 2 humano . 3. Triagem. 4. Técnicas imunoenzimáticas. 5. Custos e análise de custo.

SES/CCD/CD - 418/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Agradecimentos

À Deus por me proporcionar a oportunidade, e por sempre estar comigo, me dando sabedoria e forças para superar os desafios encontrados, e por sua infinita graça e compaixão, que mesmo sem merecer, são derramadas diariamente sobre minha vida

Meus pais Joseildo Rodrigues da Silva, e Rute Xavier dos Santos Silva por sempre acreditarem e investirem em mim desde a minha infância, agradeço cada conselho, cada bronca, e a cada vez que deixaram de sonhar para conseguirem realizar os meus sonhos.

Meu irmão Gabriel Xavier da Silva, que ainda que mais novo, me ensina a sonhar e me inspira a correr atrás dos meus objetivos. Tenho muito orgulho do ser humano que você está se tornando, e muito orgulho de tudo que tem conquistado. Vou sentir muita sua falta aqui no Brasil.

Minhas irmãs Larissa Xavier da Silva, e Leticia Xavier da Silva, que de forma inesperada entraram em minha vida dando muito mais cor e alegria, a vida ficou muito mais leve depois da chegada de vocês duas.

Minha noiva Deise de Farias Silva, meu porto seguro, minha conselheira e minha fonte de inspiração, obrigado por sempre me ouvir e ser a melhor companheira que um homem poderia ter.

À minha orientadora Adele Caterino de Araujo, pela oportunidade de fazer parte do laboratório, pela paciência, pelas incontáveis oportunidades que me proporcionou durante o curso, por todos os conselhos dados, por todos os puxões de orelha, e por todo o aprendizado; aprendizado esse que levarei para o resto da minha vida. Graças a você estou saindo do laboratório um profissional e um ser humano muito melhor, muito obrigado por tudo.

À Karoline Rodrigues Campos, pelo companheirismo, por tudo que me ensinou durante esse período, e pelas muitas horas que poderiam ser investidas em seu projeto, mas que foram investidas me auxiliando e tirando as minhas dúvidas.

À Todos que passaram pelo laboratório de HTLV durante o desenvolvimento de minha dissertação, Fabiana, Ellen, Tamirez e Gabriela, pela amizade, experiências e conhecimento compartilhado.

A Todo o Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, por me acolherem e estarem a disposição para me auxiliarem sempre que precisei.

À Pós-graduação da Coordenadoria de Controle de doenças: à todos professores pelas disciplinas enriquecedoras que tive oportunidade de cursar, à coordenação por todo o apoio e profissionalismo, e a todos os meus colegas de classe por todas as experiências que compartilhamos. Aprendi muito com todos vocês.

Aos membros da banca examinadora, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da pesquisa de mestrado por meio de bolsa de estudos, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

Resumo

Silva RX. Avaliação do emprego de *pool* de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2

Os vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos um e dois (HTLV-1 e HTLV-2) são endêmicos no Brasil. A triagem para HTLV-1/2 é obrigatória em bancos de sangue no país desde 1993, e a partir de 2014 é recomendada ao menos uma vez no acompanhamento de pacientes com HIV/aids, mas não em outras populações consideradas de risco para adquirir/transmitir esta infecção, como por exemplo, gestantes e pacientes com hepatites virais dos tipos B e C. Como o número de indivíduos em risco para adquirir/transmitir os HTLV a serem testados anualmente no Brasil é alto, qualquer estratégia que reduza o custo da triagem sorológica é necessária e bem vinda. O presente estudo avaliou o desempenho e o custo-minimização do uso de *pool* de soros na triagem sorológica de infecção por HTLV-1/2. Oitenta e uma amostras de soro sabidamente positivas para HTLV-1/2 foram retestadas utilizando dois ensaios imunoenzimáticos na triagem (EIA Murex HTLV I+II, Diasorin, e GOLD ELISA HTLV-1/2, REM) e dois testes confirmatórios [Western blot (WB), HTLV BLOT 2.4, MP Biomedicals e imunoensaio de linha (LIA), INNO-LIA HTLV I/II Score, Fujirebio], e separadas de acordo com os valores de DO/*cut-off* em: fortemente reagentes (DO/*cut-off* >12), e moderadamente reagentes (DO/*cut-off* >2,0 a 12,0). Posteriormente, estas amostras foram diluídas na razão dois em bolsa de plasma negativa para marcadores de banco de sangue até a perda de reatividade, e em seguida diluídas em diferentes *pools* de soros positivos e negativos para HIV, HBV e HCV, com vistas a determinar, respectivamente, a maior diluição de soro sem perda de sensibilidade e garantir a especificidade da reação. Subsequentemente, amostras com volume suficiente para ensaios de validação de métodos de diagnóstico segundo os parâmetros estabelecidos pelo Instituto Adolfo Lutz (P-SG-0022) foram selecionadas e testadas quanto à estratégia de *pool* de soros; 40 *pools* foram utilizados nos testes de acurácia e sete *pools* nos de precisão. Para o

cálculo de redução de custo (custo-minimização), 2.000 amostras de soro/plasma de pacientes com hepatites virais B e C, e 625 amostras de plasma de pacientes com HIV/aids que haviam sido testadas individualmente e cujos resultados haviam sido publicados foram avaliadas em *pool*. Os resultados obtidos mostraram que o *kit* Murex foi mais sensível podendo ser diluído na razão 1:5 sem perda de sensibilidade e especificidade diagnóstica, com resultados de exatidão, precisão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de 100% (coeficiente de correlação Kappa = 1). Em populações de risco, o uso da estratégia de *pool* de soros mostrou a mesma sensibilidade da análise individual, e uma redução de custo de 70,4% no grupo HBV, 60,7% no grupo HCV e 73,6% no grupo HIV/aids; estando o custo-minimização relacionado à prevalência da infecção nas populações de estudo: 1,9% (HBV), 4,0% (HCV), e 1,1% (HIV/aids). Concluindo, os resultados obtidos permitem sugerir a introdução da triagem sorológica para HTLV-1/2 utilizando *pool* de cinco soros e o *kit* Murex em inquéritos epidemiológicos, no acompanhamento de pacientes com outras infecções virais e possivelmente em gestantes no pré-natal.

Palavras-Chave: HTLV-1, HTLV-2, triagem, ensaio imunoenzimático, *pool* de soros, custo-minimização.

Abstract

Silva RX. **Evaluation of the use of pooling sera in screening for HTLV-1/2 infection**

The human T-cell lymphotropic viruses type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) are endemic in Brazil. HTLV-1/2 screening is mandatory in blood banks in the country since 1993, and from 2014 it is recommended at least once in the follow-up of patients with HIV/AIDS, but not in other populations considered at risk for acquiring/transmitting these infections, such as pregnant women and patients with viral hepatitis B and C. As the number of individuals at risk for acquiring/transmitting HTLV to be tested annually in Brazil is high, any strategy that reduces the cost of screening is necessary and welcomed. The present study evaluated the performance and cost-minimization of the use of pooling sera in serological screening for HTLV-1/2 infections. Eighty-one HTLV-1/2 truly positive serum samples were retested using two screening enzyme-linked immunoassays (EIA Murex HTLV I + II, Diasorin, and GOLD ELISA HTLV-1/2, REM) and two confirmatory assays [Western blot (WB), HTLV BLOT 2.4, MP Biomedicals and Line Immunoassay (LIA), INNO-LIA HTLV I / II Score, Fujirebio], and separated according to OD/cut-off values into: strongly reagents (OD/cut-off> 12), and moderately reagents (DO/ cut-off> 2.0 to 12.0). Subsequently, these samples were diluted at ratio two in serum from negative blood bag for infectious blood-borne diseases until the loss of reactivity to determine the highest serum dilution without loss of sensitivity, and next diluted in different pools of positive and negative HIV, HBV and HCV sera to ensure the specificity of the pooling strategy. Afterwards, samples with sufficient volume for diagnostic method validation assays according to the parameters established by the Adolfo Lutz Institute (P-SG-0022) were selected and tested for the pooling strategy: 40 pools for accuracy and 7 pools for precision analysis. For cost-minimization calculation, 2,000 serum/plasma samples from patients with viral hepatitis B and C and 625 plasma samples from patients with HIV/AIDS

that had been individually tested and the results had been published elsewhere were tested in pooling. The results obtained showed that the Murex kit was more sensitive and could be used at 1:5 dilution without loss of sensitivity. The accuracy, precision, sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were 100% (Kappa correlation coefficient = 1). In at-risk populations, the use of the serum pooling strategy reduced the cost of screening (cost-minimization) by 70.4% in the HBV, 60.7% in the HCV, and 73.6% in HIV/AIDS groups of patients, which depended on the prevalence of HTLV-1/2 in such populations: 1.9% (HBV), 4.0% (HCV), e 1.1% (HIV/aids). In conclusion, the results obtained suggest the introduction of HTLV-1/2 serological screening using pooling of five sera and the Murex kit in epidemiological surveys, in the follow-up of patients with other viral infections and possibly in prenatal screening programs.

Key-words: HTLV-1, HTLV-2, screening, enzyme immunoassays, pooling of sera, cost-minimization.

Lista de abreviaturas e siglas

AIDS	*Acquired immunodeficiency syndrome* - Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATLL	*Adult T-cell leukemia/lymphoma* - Leucemia/linfoma de células T do adulto
CCR5	Receptor do tipo 5 de quimiocinas com domínio CC
CD4	*Cluster of differentiation* 4 - Grupamento de diferenciação 4
CD8	*Cluster of differentiation* 8 - Grupamento de diferenciação 8
CIM-IAL	Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz central
cut-off	Ponto de corte de reação imunoenzimática que define a positividade ou negatividade da amostra analisada
CV	Carga viral
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EIA	*Enzyme immuno assay* - Ensaio imunoenzimático
ELISA	*Enzyme linked immuno sorbent assay* - Ensaio de imunoabsorção enzimática
env	Região genômica que codifica o envelope viral
F	Fortemente reagente
gag	Região genômica que codifica proteína do *core* viral
HAM/TSP	*HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis* - Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical
HBV	*Hepatitis B virus* - Vírus da hepatite B
HCV	*Hepatitis C virus* - Vírus da hepatite C
HIV	*Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homens que fazem sexo com homens

HTLV	*Human T-cell lymphotropic virus* - Vírus linfotrópico de células T humanas
HTLV-1	*Human T-cell lymphotropic virus type 1* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1
HTLV-2	*Human T-cell lymphotropic virus type 2* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
HTLV-3	*Human T-cell lymphotropic virus type 3* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 3
HTLV-4	*Human T-cell lymphotropic virus type 4* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 4
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ig (G)	Imunoglobulina de classe G
INNO-LIA	*Innogenetics line immuno assay* - imunoensaio de linha da companhia Innogenetics
Kit	Conjunto de reagentes
LIA	*Line Immunoassay* - Imunoensaio de linha
M	Moderadamente reagente
MIP-1α	*Macrophage inflammatory protein 1 alpha* - Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Proteína
PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells* - Células mononucleares do sangue periférico
PCR	*Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase
QALY	*Quality-adjusted life years* - Anos de vida ajustados pela qualidade

rgp	*Recombinant glicoprotein* - Glicoproteína recombinante
ROC	*Receive operating characteristics* - Características de operação do receptor
S/*cut-off*	*Signal to cut-off* - Sinal de quimioluminescência/ponto de corte de reação imunoenzimática que define a positividade ou negatividade da amostra analisada
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UDI	Usuários/Uso de drogas Injetáveis
WB	*Western Blot*

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica do HTLV-1 no mundo..... 18

Figura 2. Distribuição geográfica do HTLV-1/2 em bancos de sangue no Brasil. 19

Figura 3. Prevalência de HTLV-1 em gestantes no Brasil. 25

Figura 4. Perfil de bandas apresentado no teste Western Blot (HTLV BLOT 2.4). 38

Figura 5. Ilustração da disposição das bandas apresentadas no ensaio INNO-LIA (INNO-LIA HTLV I/II Score). 40

Figura 6. Esquema de diluição das cinco amostras HTLV de diferentes DO/cut-off, usando bolsa de plasma negativa para HIV, HBV e HCV..... 41

Figura 7. Esquema de preparação de *pools* usando amostras de soro positivas para HIV, HBV, HCV, e negativas para essas infecções. 41

Figura 8. Fluxograma de etapas e amostras utilizadas na estratégia de *pool* de soros aplicada para a triagem de infecção por HTLV-1/2..... 44

Tabela 1. Resultados de maior diluição de soros com DO/*cut-off* fortemente e moderadamente reagentes, capaz de detectar casos verdadeiramente positivos para HTLV-1 e HTLV-2, utilizando os *kits* Murex e GOLD ELISA na triagem de HTLV-1/2. 47

Tabela 2. Resultados da triagem de infecção por HTLV-1/2 usando amostras de soros com DO/Cut-off fortemente e moderadamente reagentes, sem diluição e diluídas em pool de cinco soros HIV, HBV ou HCV positivos e negativos, usando o kit Murex.....47

Figura 9. Valores de DO/cut-off obtidos com os 40 pools de soros testados para a infecção por HTLV-1/2 em cinco dias consecutivos para a determinação de acurácia..... 48

Tabela 3. Resultados da análise de precisão intra-ensaio (repetibilidade) para validação do uso de pool de soros na triagem sorológica para HTLV-1/2. 50

Tabela 4. Resultados da análise de precisão inter-ensaio (reprodutibilidade) para validação do uso de pool de soros na triagem sorológica para HTLV-1/2. 51

Figura 10. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HBV, utilizando a triagem individual e a triagem com *pool* de cinco soros. 53

Figura 11. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HCV, utilizando a triagem individual e a triagem com *pool* de cinco soros. 54

Figura 12. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HIV, utilizando o *kit* GOLD ELISA na triagem individual e na triagem com *pool* de dois soros. 56

Figura 13. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HIV, utilizando o *kit* Murex na triagem individual e na triagem com *pool* de cinco soros. 57

Índice

Resumo

Abstract

1. Introdução 16

1.1. HTLV e doenças relacionadas 16

1.2. Epidemiologia 17

1.3. Vias de transmissão 20

1.4. Coinfecções 25

1.5. Custos da triagem HTLV 29

1.6. *Pool* de soros 30

2. Objetivos 33

2.1. Objetivo geral 33

2.2. Objetivos específicos 33

3. Material e Métodos 34

3.1. Casuística 34

3.1.1. Populações de risco 35

3.2. Métodos 36

3.2.1. Triagem sorológica 36

3.2.2. Testes confirmatórios 37

3.2.2.1. *Western blot* (WB) 37

3.2.2.2. INNO-LIA 38

3.2.3. Exequibilidade da utilização de *pools* de soros 40

3.2.4. Validação 42

3.2.4.1. Acurácia (Exatidão) 42

3.2.4.2. Precisão intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaio (reprodutibilidade) 43

3.2.5. Análise de custo 43

3.2.6. Análise dos resultados 44

3.2.7. Aspectos éticos 45

3.2.8. Limitações do estudo 45

3.2.9. Conflito de interesse 45

4. Resultados 46

4.1. Avaliação do número de amostras para compor o *pool* e do melhor *kit* 46

***4.2.* Validação do uso de *pool* de soros 48**

4.2.1. Cálculo de acurácia (exatidão) 48

4.2.2. Cálculo de precisão intra-ensaio (repetibilidade) 49

4.2.3. Cálculo de precisão inter-ensaio (reprodutibilidade) 51

4.3. Cálculo de redução de custos (custo-minimização) 52

4.3.1. Hepatites Virais 52

4.3.1.1. Hepatite B 52

4.3.1.2. Hepatite C 53

4.3.2. HIV/aids 54

5. Discussão 58

6. Conclusão 75

7. Referências Bibliográficas 76

1. Introdução

1.1. HTLV e doenças relacionadas

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1, do inglês *human T-cell lymphotropic virus type 1*), foi o primeiro retrovírus humano a ser descrito, sendo isolado por Poiesz e colaboradores em 1980, a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T (Poiesz et al., 1980). O vírus pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, e ao gênero Deltaretrovírus (CITV, 2018). Após a aquisição do vírus, cerca de 90% dos seus portadores permanecem assintomáticos durante o resto de suas vidas, entretanto, existe uma parcela de infectados que desenvolvem doenças graves.

Após a sua descoberta, o HTLV-1 foi associado à leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL, do inglês *adult T-cell leukemia/lymphoma*), uma doença hematológica de alta letalidade, que já havia sido anteriormente descrita, em 1977, no Japão (Uchiyama et al., 1977). Posteriormente, também foi relacionado à mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP, do inglês *HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis*), uma doença neurológica grave, de alta morbidade (Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986; Ribas & Melo, 2002; Gallo, 2005; Gonçalves et al., 2010; Romanelli et al., 2013; Carneiro-Proietti, 2015). Além disso, outras manifestações de relevância clínica também têm sido relacionadas ao HTLV-1, como uveítes, artrite reumatóide, dermatite infecciosa, polimiosite, tireoidite, estrongiloidíase, distúrbios urinários, disfunção erétil, entre outras (Romanelli et al., 2010; Carneiro-Proietti, 2015; Haziot et al., 2019).

Alguns anos depois, em 1982, o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2) foi descrito e isolado de um paciente com tricoleucemia de células T (Kalyanaraman et al., 1982). O HTLV-2 possui diferenças genotípicas e antigênicas em relação ao HTLV-1; suas

sequências de nucleotídeos apresentam uma similaridade de cerca 65% (*apud* Carneiro-Proietti, 2015). Em contraste ao HTLV-1, seu potencial patogênico ainda não está bem estabelecido, apenas alguns casos têm sido descritos em literatura, correlacionando o vírus a doença neurológica semelhante à HAM/TSP e a outras manifestações neurológicas, ao aumento da incidência de pneumonia, bronquite, tuberculose e aumento da taxa de mortalidade por câncer, além de outras complicações (Araujo & Hall, 2004; *apud* Roucoux & Murphy, 2004; Biswas et al., 2010).

Em relação ao tropismo, o HTLV-1 tem tropismo preferencial por células T CD4+, enquanto o HTLV-2 infecta preferencialmente células T CD8+ (Bangham et al., 2014; Melamed et al., 2014).

Em 2005, foram descritos o HTLV-3 e HTLV-4, o primeiro foi identificado em dois indivíduos assintomáticos em Camarões, África Central, e o segundo em um caçador do mesmo país. Até o momento pouco se conhecesse a respeito da patogenia desses vírus, e não foi descrita associação com doença humana (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005; Mahieux & Gessain, 2011).

1.2. Epidemiologia

Segundo estimativa baseada apenas em dados publicados, existe aproximadamente 5 a 10 milhões de pessoas infectadas por HTLV-1 em todo o mundo, sendo endêmico nas seguintes regiões: sudoeste do Japão, Caribe, continente Africano, Oriente médio, Romênia, Ilhas na Melanésia e América do Sul (**Figura 1**). Segundo este levantamento, o Brasil é considerado uma das maiores áreas endêmicas para a infecção por HTLV-1 e doenças associadas; com uma estimativa de até 800.000 pessoas infectadas pelo vírus (Gessain & Cassar, 2012).

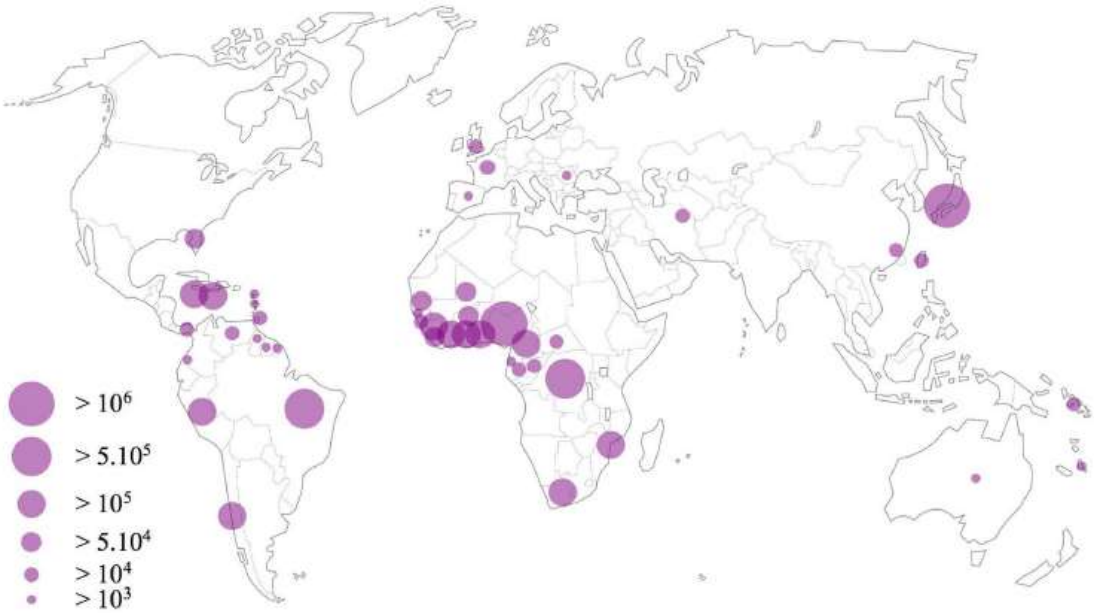

Figura 1. Distribuição geográfica do HTLV-1 no mundo.
Fonte: Gessain & Cassar, 2012.

Porém, ocorre que, as infecções por HTLV-1/2 são subestimadas no Brasil e no mundo, elas não constam da lista de doenças de notificação compulsória, e a triagem não é obrigatória em bancos de sangue em todos os países. Além disso, países populosos como Índia, China e grande parte da Rússia, não fornecem informações detalhadas a respeito da infecção por HTLV. Como consequência, acredita-se que o número atual de infectados descrito em literatura seja subestimado, e que seja pelo menos o dobro do relatado (Willems et al., 2017; Tagaya et al., 2019).

Em relação ao HTLV-2, sabe-se que ele é endêmico em populações indígenas nas Américas do Norte, Central e Sul, sendo descrito em diversas tribos indígenas do Brasil, principalmente na região amazônica. Também é endêmico entre tribos de pigmeus na África, e entre usuários de drogas injetáveis (UDI), principalmente dos Estados Unidos e Europa (*apud* Roucoux & Murphy, 2004; Mauclère et al., 2011; Paiva & Casseb, 2015; Braço et al., 2019).

No tocante a prevalência nacional dos HTLV-1/2, esses vírus possuem uma distribuição heterogênea, com taxas que variam dependendo

da região geográfica e do *background* genético dos indivíduos. Em 2005, Catalan-Soares e colaboradores realizaram um estudo com base nas prevalências de HTLV-1/2 encontradas em bancos de sangue no país; os autores constataram que a menor prevalência era na região sul, enquanto as regiões norte e nordeste apresentavam as prevalências mais altas (**Figura 2**) (Catalan-Soares et al., 2005).

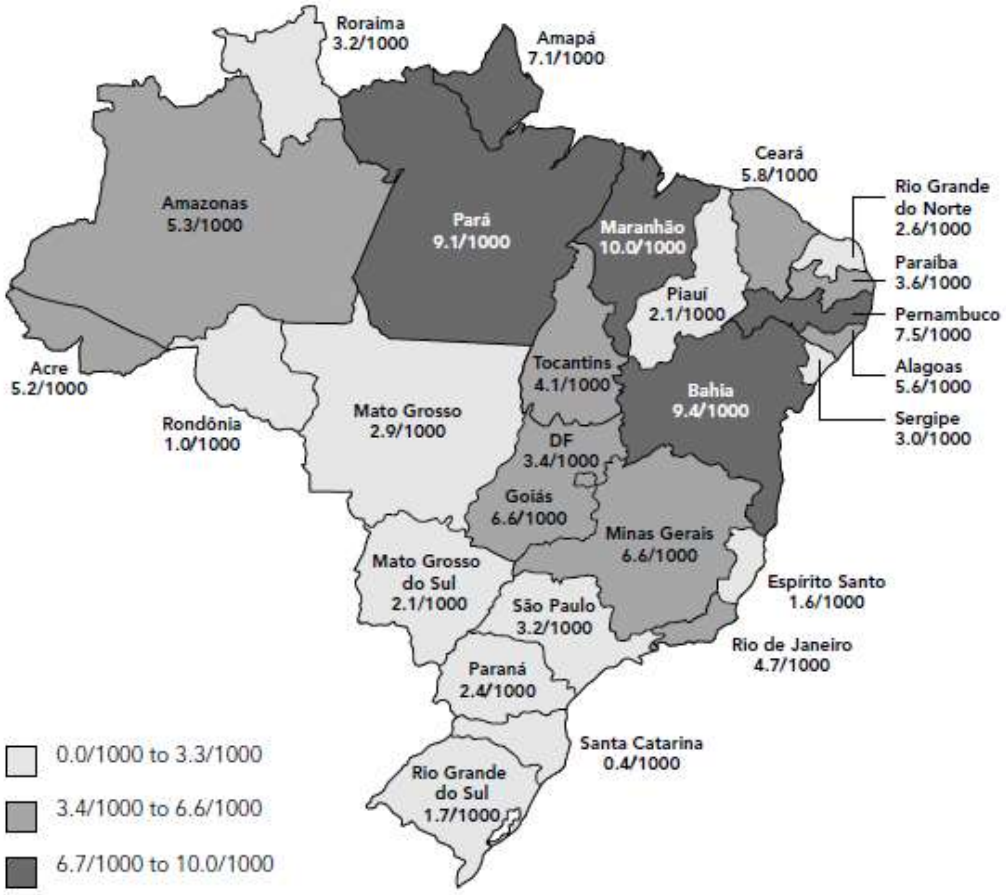

Figura 2. Distribuição geográfica do HTLV-1/2 em bancos de sangue no Brasil.

Fonte: Catalan-Soares et al., 2005.

Acredita-se que as diferentes taxas de prevalência de HTLV-1/2 descritas no país possam estar associadas à sua colonização, já que a mais de 13.000 anos houve uma intensa imigração asiática para as regiões norte e nordeste do Brasil, além do tráfico de escravos africanos durante a

colonização portuguesa nos séculos XVI a XVIII. Entre os séculos IX e início do século XX houve a imigração japonesa e europeia, a última principalmente para as regiões sul e sudeste do país. Isto justifica diferentes *backgrounds* genéticos e, consequentemente, distribuição geográfica distinta de populações e áreas endêmicas de HTLV-1/2 no Brasil (Vallinoto et al., 2004; Paiva & Casseb, 2015)

1.3. Vias de transmissão

Os HTLV-1/2 possuem três principais vias de transmissão: parenteral, sexual e vertical. A via parenteral ocorre a partir do contato com sangue infectado, principalmente por meio de transfusão sanguínea e pelo compartilhamento de agulhas e seringas infectadas entre UDI. Ela tem sido descrita como a via de transmissão mais eficaz do vírus; acredita-se que a transfusão de componentes celulares sanguíneos resulta em soroconversão em mais de 40% dos casos. Além disso, há uma associação entre a aquisição do HTLV-1 por via parenteral e o desenvolvimento de doenças. A literatura relata uma maior prevalência de HAM/TSP entre pacientes que adquiriram a infecção por transfusão sanguínea (Gonçalves et al., 2010; Paiva & Casseb, 2014; Tagaya et al., 2019).

No passado, a transmissão por via parenteral ocorria principalmente graças à transfusão de sangue não testado para HTLV-1/2, entretanto, levando em consideração este risco, desde a década de 1980 diversos países introduziram a triagem para HTLV em bancos de sangue. O primeiro país a realizar a triagem foi o Japão (1986), seguido dos Estados Unidos (1988), Canadá (1989) e França (1991); no Brasil, a triagem para HTLV é obrigatória em todos os bancos de sangue do país desde novembro de 1993 (Andersson et al., 2001; Chang et al., 2002; Brasil, Ministério da Saúde, 1993).

Além disso, na década de 1980, em resposta ao surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês *Acquired*

Immunodeficiency Syndrome) e do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), no Brasil e em diversos países teve início a política de redução de danos aos UDI. Na época, a via de transmissão parenteral do HIV era extremamente preocupante; a transmissão ocorria principalmente entre UDI, e o uso de drogas injetáveis era responsável por quase 20% do número total de casos de aids no Brasil, sendo a cocaína a droga injetável mais utilizada. Em resposta a epidemia observada no país, foram distribuídos aos UDI *kits* contendo seringas e agulhas descartáveis para serem usadas na droga adição; consequentemente, observou-se uma diminuição dos casos de infecção por HIV nesta população. Como o HIV e os HTLV-1/2 compartilham as mesmas vias de infecção, esta medida fez com que a prevalência de HTLV também diminuísse entre os UDI. Ademais, na década de 1990, a cocaína injetável foi substituída pela cocaína inalada e fumada (crack). Todos esses fatores contribuíram para que a via de transmissão parenteral pelo HTLV diminuísse nos dias atuais (Mesquita et al., 2001; Mesquita et al., 2003; *apud* Caterino-de-Araujo et al., 2015; Cruz, 2017).

Apesar da diminuição observada, os UDI permanecem uma importante população de risco. Idade avançada, raça/cor negra, compartilhamento de agulhas e seringas, e uso prolongado de drogas injetáveis, são alguns fatores de risco associados à alta prevalência HTLV-1/2. Vale ressaltar que entre os UDI circula principalmente o HTLV-2 e há alta prevalência de coinfecção HIV/HTLV-2 nesta população (Caterino-de-Araujo et al., 2015; Koech et al., 2018).

Em relação à via de transmissão sexual, ela ocorre através de relações sexuais sem uso de preservativo. Trabalhadores do sexo, homens que fazem sexo com homens (HSH), população privada de liberdade, e parceiros sexuais de portadores de HTLV, são consideradas as populações vulneráveis a adquirir a infecção por essa via. Comportamentos de risco como ter múltiplos parceiros, fazer sexo com UDI, possuir parceiro sexual residente em área endêmica para HTLV, e tempo de relacionamento (devido

a repetidas exposições), são descritos como os principais fatores de risco associados à transmissão sexual (*apud* Paiva & Casseb, 2014; Paiva et al., 2017; Castro et al., 2018).

Há escassez de dados da prevalência atual de transmissão sexual nessas populações, sabe-se apenas que a transmissão sexual é mais eficiente quando ocorre do homem para a mulher. Linfócitos infectados são considerados os vetores primários na transmissão sexual, e há uma maior concentração desses linfócitos no sêmen em comparação aos presentes na secreção vaginal, o que pode justificar a maior eficiência de transmissão do homem para a mulher. Possuir alta carga proviral em células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*), também pode aumentar a excreção genital de HTLV-1, e consequentemente, aumentar o risco de transmissão sexual. Além disso, a ocorrência de infecções genitais e infecções sexualmente transmissíveis, também pode facilitar a aquisição da infecção pelas mulheres; essas complicações causam lesões que expõe as células alvos na mucosa vaginal, tornando-as mais suscetíveis a infecção (*apud* Paiva & Casseb, 2014; Paiva et al., 2017; Oliveira et al., 2018).

Já a transmissão vertical que ocorre de mãe para filho, é a via de transmissão que mais preocupa na atualidade. Alguns estudos desenvolvidos nas décadas de 1980 e 1990, principalmente no Japão, relataram menor taxa de transmissão vertical em crianças que não foram amamentadas, em comparação as amamentadas, evidenciando que a transmissão se dava primordialmente pelo leite materno. Neles, observou-se que crianças amamentadas por menos tempo apresentavam taxas de soroconversão menores em comparação às crianças amamentadas por mais tempo; sendo considerados seis meses o tempo crítico para aumentar o risco de transmissão (Hino et al., 1987; Hino, 2011). Estudos desenvolvidos em outras partes do mundo corroboraram esses dados (*apud* Percher et al., 2016; *apud* Rosadas et al., 2018; Paiva et al., 2018).

A transmissão vertical do HTLV-1 pela via oral parece estar associada à baixa resposta imune, alta carga proviral e maior propensão ao desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1, principalmente ATLL, porém o desenvolvimento de HAM/TSP e outras doenças também podem ocorrer. Como consequência, essa via é a responsável pelos novos casos de doenças descritos em crianças e adolescentes (Bittencourt et al., 2006; *apud* Oliveira et al., 2018; Varandas et al., 2018; *apud* Rosadas & Taylor, 2019).

A transmissão vertical, juntamente com a transmissão sexual, também desempenha um papel importante na transmissão intrafamiliar do HTLV-1; através dessa via o vírus pode ser mantido por diversas gerações na mesma família, inclusive de maneira silenciosa, visto que apenas cerca de 10% dos infectados desenvolvem doenças (Mello et al., 2014; Mendes et al., 2016; Frutos et al., 2017).

Dentre os fatores de risco associados à transmissão vertical estão: maior tempo de amamentação, mãe com alta carga proviral no sangue e no leite, mãe com HAM/TSP, estrongiloidíase, baixa renda familiar e classificação socioeconômica C ou D (Ureta-Vidal et al., 1999; Hisada et al., 2002; Gotuzzo et al., 2007; *apud* Carneiro-Proietti et al., 2014; Paiva et al., 2018).

No Japão, na cidade de Nagasaki, taxa de transmissão vertical de aproximadamente 20% era descrita em 1987. Após a prefeitura introduzir a sorologia para HTLV no pré-natal e aconselhar as mães soropositivas a não amamentarem, amamentarem por pouco tempo, ou ainda aquecerem o leite a 60 °C por 30 minutos ou congelarem por uma noite para inativar vírus, a taxa de transmissão vertical caiu para 2,5% (para as mães que não amamentavam) e, para 7,4% (para as mães que passaram a amamentar por menos de seis meses). Este estudo evidenciou a importância da amamentação na transmissão viral e a importância da triagem sorológica para HTLV-1/2 no acompanhamento de gestantes. Digno de nota, desde

2010, o Japão realiza a triagem para HTLV em gestantes em todo o território nacional (Hino, 2011).

No Brasil, a testagem de infecção para HTLV-1/2 não consta no rol de exames solicitados durante o pré-natal no Sistema Único de Saúde (SUS), tampouco em gestantes que fazem o acompanhamento na rede privada e que poderiam se beneficiar desta sorologia.

Estudos que abordam a prevalência de HTLV-1 em gestantes no Brasil, embora sejam escassos e não tenham sido realizados em todos os estados, apresentam resultados distintos, com prevalências que variam entre 0% a 1,05% (Olbrich-Neto & Meira, 2004; Figueiró-Filho et al., 2005; Oliveira & Avelino, 2006; Magalhães et al., 2008; Dal Fabbro et al., 2008; Machado Filho et al., 2010; Sequeira et al., 2012; Souza et al., 2012; Boa-Sorte et al., 2014; Mello et al., 2014; Monteiro et al., 2014; Moura et al., 2015; Guerra et al., 2018; Sodré Barmpas et al., 2019).

Segundo levantamento realizado por Rosadas e colaboradores em gestantes no Brasil, tomando como base apenas trabalhos robustos com poder de análise estatística, as regiões norte e nordeste foram as que apresentaram as maiores taxas no país, sendo a Bahia o estado com a maior prevalência e o Amazonas com a prevalência mais baixa; porém há que se destacar que em muitos estados o dado era inexistente ou inconsistente (Rosadas et al., 2018) (**Figura 3**).

Com base neste levantamento e dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), uma estimativa feita no ano de 2018 mostrou que existem por ano no Brasil, aproximadamente 16.548 gestantes infectadas por HTLV-1, o que pode resultar em mais de 3.000 casos de infecções devido à transmissão vertical por ano no país. Destes, mais de 2.600 são casos que ocorrem devido à amamentação, e que, seguindo o exemplo de Nagasaki, poderiam ser evitados, caso a triagem sorológica fosse realizada nas gestantes no pré-natal. Tomando como base o risco de desenvolver HAM/TSP e ATLL descritos em literatura, estima-se que

ocorram entre 8 a 272 casos de HAM/TSP, e 120 a 604 casos de ATLL por ano devido à transmissão vertical no país. Em relação ao custo dos doentes com ATLL e HAM/TSP para o SUS, devido à elevada taxa de letalidade/morbidade dessas doenças, apenas isto já justificaria a introdução da sorologia para HTLV-1/2 no pré-natal (Rosadas et al., 2018).

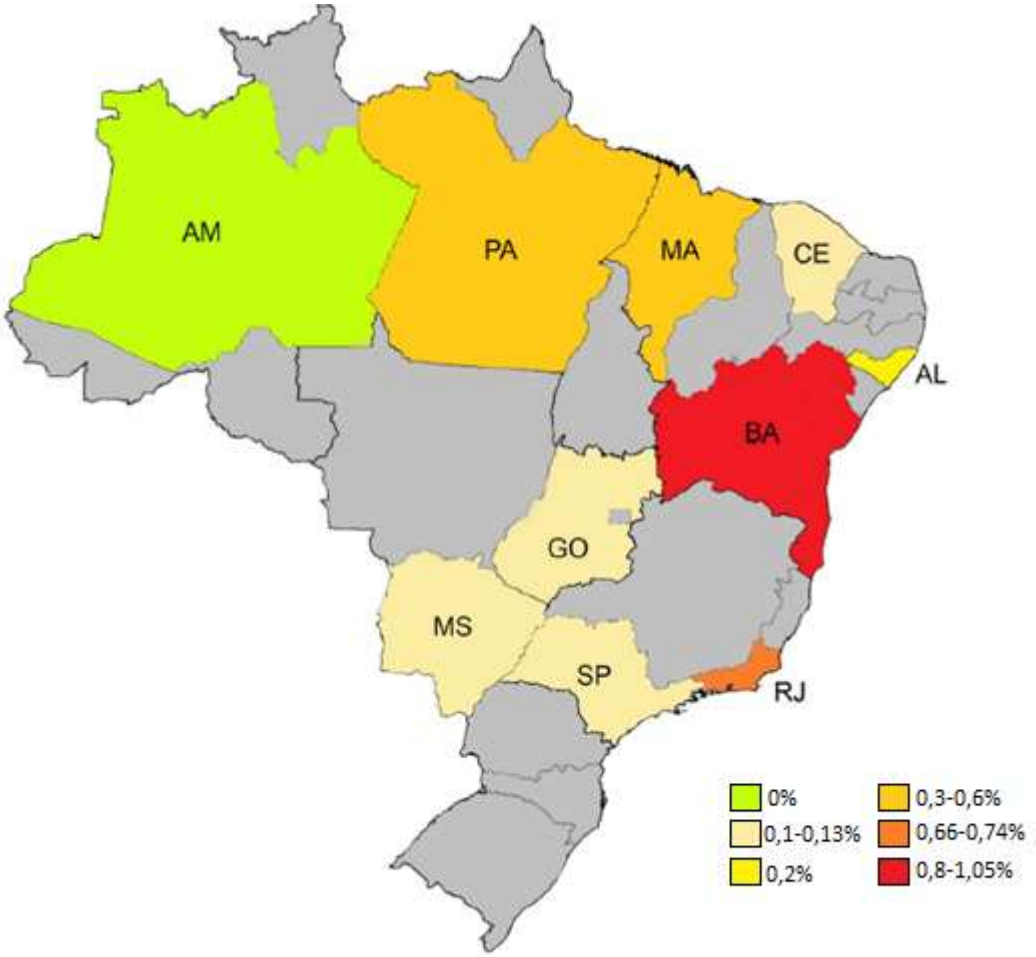

Figura 3. Prevalência de HTLV-1 em gestantes no Brasil.
Fonte: adaptado de Rosadas et al., 2018.

1.4. Coinfecções

O HIV, e os vírus das hepatites B (HBV, do inglês *hepatitis B virus*) e C (HCV, *hepatitis C virus*) compartilham vias de transmissão com os HTLV-1/2, portanto as coinfecções por esses vírus podem acontecer e resultar em

alteração no curso natural dessas infecções e das doenças a elas associadas.

Um estudo realizado em São Paulo com casuística dos anos de 2014-2015 mostrou uma prevalência de HTLV-1/2 de 1,3% em pacientes com hepatite B, e de 5,3% em pacientes com hepatite C. Nesse trabalho a infecção por HTLV se associou à infecção por HIV em 87,5% e 27,3% dos casos HBV e HCV, respectivamente (Caterino-de-Araujo et al., 2018). Outro estudo recentemente conduzido pelo mesmo grupo de pesquisadores com casuística de 2015-2016 revelou 1,9% e 4,0% de infecção por HTLV-1/2 nos casos de hepatite B e C, respectivamente, e 58.3% (HBV) e 53.6% (HCV) associados à infecção por HIV (Caterino-de-Araujo et al., 2020). Ou seja, embora com percentuais distintos, quase metade dos pacientes com hepatites virais em São Paulo e seus clínicos desconhecem o status HTLV e possivelmente o impacto da coinfecção HBV/HTLV e HCV/HTLV nos marcadores virais e na progressão das doenças hepáticas, visto que o Ministério da Saúde (MS) do Brasil, desde 2014, recomenda a sorologia para HTLV-1/2 no acompanhamento de pacientes com HIV (Brasil, Ministério da Saúde, 2014). Ainda, embora os percentuais de infecção pelos HTLV-1/2 nas hepatites B e C pareçam baixos, eles se equiparam aos detectados atualmente em população infectada pelo HIV de São Paulo (Caterino-de-Araujo et al., 2015; Campos et al., 2017).

Quanto ao impacto das coinfecções, na coinfecção HIV/HTLV-1, a maioria dos trabalhos publicados relata um pior prognóstico para o paciente, com menor tempo de sobrevida, aumento do risco de desenvolvimento de complicações neurológicas, e progressão mais rápida para aids (Brites et al., 2001, 2009; Pedroso et al., 2011; Beilke, 2012).

O mecanismo pelo qual isto ocorre pode ser o fato de na coinfecção HIV/HTLV-1 haver um aumento no número de células T CD4+, fazendo com que mais células se tornem susceptíveis a infecção pelo HIV. Ainda, o número elevado de células CD4+ pode levar a uma falsa ideia de controle da infecção viral, e como a quantificação destas células era usada por médicos

para definir o melhor momento para iniciar a terapia antirretroviral, a sorologia para HTLV-1/2 foi recomendada pelo MS do Brasil na primeira consulta do paciente com HIV, proveniente de regiões endêmicas para este vírus (Brites et al., 2009; Brasil, Ministério da Saúde, 2014).

Em contrapartida, na coinfecção HIV/HTLV-2, o HTLV-2 parece desempenhar um papel protetor na infecção pelo HIV-1; os indivíduos coinfectados com HTLV-2 frequentemente são caracterizados como “progressores lentos” para aids, e apresentam um melhor prognóstico quando comparados aos coinfectados por HIV/HTLV-1 ou com a monoinfecção por HIV (Beilke et al., 2004, 2012; Brites et al., 2009; Turci et al., 2006).

Uma justificativa para a progressão mais lenta, é que na coinfecção HIV/HTLV-2 há uma grande expressão de uma isoforma de MIP-1α (CCL3L1) conhecida como LD78β. Essa isoforma é o ligante mais potente do CCR5 (correceptor do HIV), portanto, a LD78β produzida em excesso pode bloquear esse correceptor, impedindo que o HIV se ligue e fazendo com que os pacientes evoluam lentamente para aids (Turci et al., 2006).

Em relação às hepatites virais, a maioria dos estudos sugere que, assim como na coinfecção HIV/HTLV-1, também há um pior prognóstico na coinfecção HCV/HTLV-1. Quanto aos parâmetros virológicos na hepatite C, foram descritos menor resposta virológica sustentada, impacto negativo no *clearance* viral espontâneo de HCV e maior carga viral (CV) de HCV. Em relação à doença, foram observadas maior incidência de doenças do fígado, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, e morte por câncer de fígado. (Boschi-Pinto et al., 2000; Kishihara et al., 2001; Tokunaga et al., 2014).

Curiosamente, a maioria dos estudos conduzidos no Brasil mostram resultados contrários; eles sugerem que a coinfecção HCV/HTLV-1 pode ter impacto positivo, favorecendo o *clearance* espontâneo de HCV pela produção de citocinas pró-infamatórias, e uma menor produção de indicadores de lesão hepática (aspartato aminotransferase e alanina

aminotransferase) (Cardoso et al., 2009; Bahia et al., 2011; Moreira et al., 2013; Le Marchand et al., 2015). No entanto, estudos realizados em São Paulo com um número grande de pacientes mostram resultados que concordam com os descritos na literatura internacional, ou seja, maior CV de HCV, menor resposta virológica sustentada e menor *clearance* de HCV na coinfecção HCV/HTLV-1 (Alves et al., 2018; Campos et al., 2020).

Na coinfecção HCV/HTLV-2, Hisada e colaboradores descreveram que o HTLV-2 atuou negativamente na infecção por HCV, aumentando a sua CV (Hisada et al., 2003); em contrapartida, outro estudo descreveu detecção de menores níveis de indicadores de lesão do fígado, e uma progressão mais lenta para fibrose hepática na presença de coinfecção por HCV/HIV/HTLV-2. Neste estudo os pacientes com a tripla infecção, em comparação aos pacientes com HCV/HIV levaram mais tempo (aproximadamente cinco anos) para desenvolverem cirrose, o que indica um possível efeito protetor do HTLV-2 (Abad-Fernández et al., 2015). Os resultados discordantes podem ser devido à escolha da casuística de estudo, a diferenças no *background* genético dos pacientes e as diferentes estirpes (subtipos virais) que circulam no mundo, como relatado por vários pesquisadores (Alves et al., 2018; Ruiz-Mateos et al, 2019).

Um estudo recente conduzido em UDI infectados pelo HIV-1 e com HCV da Espanha mostrou que controladores de elite do HIV-1 e pacientes com a coinfecção por HTLV-2 controlaram a replicação do HCV, resultando em menor CV. Os autores atribuíram o alto número de células T CD8+ como responsável por estes achados (Ruiz-Mateos et al., 2019). Menor CV de HCV e maior *clearance* viral de HCV também foram observados em pacientes com hepatite C de São Paulo que apresentavam a coinfecção HCV/HTLV-2 quando comparados aos que tinham a coinfecção HCV/HTLV-1, independentemente de seu status HIV (Campos et al., 2020).

Em relação aos trabalhos publicados que abordam o impacto da infecção por HTLV em pacientes coinfectados com HBV, estes são escassos; os que foram realizados sugerem um impacto negativo do HTLV-

1. A infecção por HTLV-1 pode reduzir o *clearance* espontâneo de HBV, e o HBV pode impulsionar a expansão clonal de HTLV-1, o que aumenta o risco de desenvolvimento de ATLL (Moreira et al., 2013; Marr et al., 2017; Turpin et al., 2019).

Há que se destacar que um estudo recente em pacientes com hepatite B de São Paulo, mostrou que na coinfecção HBV/HTLV-1 houve aumento de CV de HBV e menor *clearance* viral, enquanto na coinfecção HBV/HTLV-2 houve diminuição de CV de HBV e aumento do *clearance* viral, confirmando assim o papel protetor do HTLV-2 tanto na infecção por HIV quanto por HBV e HCV (Campos et al., 2020).

Apesar das informações descritas anteriormente e de os pacientes com hepatites virais serem considerados um grupo de risco para adquirir a infecção por HTLV-1/2, a triagem sorológica para HTLV-1/2 não é recomendada no acompanhamento de pacientes com hepatites virais no Brasil.

1.5. Custos da triagem HTLV

Pelo exposto, fica claro que existem lacunas que precisam ser preenchidas no que se diz respeito à triagem para HTLV-1/2 em populações vulneráveis e de risco. Ademais, levando em consideração as prevalências regionais e as condições socioeconômicas, existe um debate mundial sobre o custo da triagem sorológica. Diversos países se questionam sobre o beneficio em se utilizar uma quantidade considerável de recursos financeiros para a triagem HTLV-1/2 em países com uma baixa prevalência. Países como a Dinamarca e a Suécia passaram a realizar a triagem apenas em novos doadores de sangue, como forma de minimizar os custos com ensaios sorológicos. Já a Noruega e a Finlândia, após anos sem identificar um caso positivo, suspenderam a triagem em bancos de sangue em 2007 e em 2008, respectivamente. Outros países europeus como a Bélgica, Alemanha, Itália,

Espanha, entre outros, não realizam essa triagem de forma universal e sequer cogitam em introduzi-la (Laperche et al., 2009).

Na Arábia Saudita todos os doadores em bancos de sangue são testados para HTLV-1/2, entretanto, considerando a baixa prevalência no país, a testagem vem sendo realizada apenas em doadores provenientes de países onde os HTLV são endêmicos e em populações de risco para adquirir a infecção (Hindawi et al., 2018). Na Austrália, a triagem também acontece de maneira universal, mas a testagem apenas em novos doadores parece ser de melhor custo/benefício (Styles et al., 2017).

Na África do Sul, um estudo recente analisou o custo de se realizar a triagem para HTLV-1/2 em bancos de sangue de três formas distintas: (i) triagem universal em todos os doadores, (ii) triagem apenas uma vez em cada doador (triagem em todos doadores e depois apenas em novos doadores), e (iii) triagem apenas em novos doadores. Em decorrência dos altos custos, nenhuma dessas alternativas se mostrou custo/efetiva em longo prazo. Isto devido à baixa condição socioeconômica e ao pouco investimento em saúde no país. Assim, os autores discutem que é mais importante que o dinheiro empregado na triagem para HTLV seja aplicado em programas de prevenção e de atenção primária à saúde no país (Vermeulen et al., 2019).

Levando todas estas informações em consideração, qualquer medida que possa diminuir o custo da triagem para HTLV-1/2 em regiões endêmicas, em populações vulneráveis e de risco, sem perda de sensibilidade diagnóstica, é necessária e bem vinda.

1.6. *Pool* de soros

A estratégia do uso de *pool* de soros parece ser uma alternativa exequível para diminuir esses custos, principalmente em países com baixas prevalências. Essa estratégia foi utilizada na triagem de HIV, principalmente

durante as décadas de 1980 e 1990, onde foi descrita como uma abordagem factível e de menor custo, além de ser tão sensível e específica quanto à triagem individual. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou o uso de cinco amostras no *pool* em países onde a prevalência de HIV era menor que 2%, ou em países com poucos recursos financeiros (Monzon et al., 1992; Tamashiro et al., 1993).

Como as técnicas de triagem para HIV e HTLV são semelhantes, teoricamente o emprego de *pool* de soros poderia ser utilizado também na triagem de HTLV. Entretanto, não existe recomendação oficial da OMS, e são escassos os trabalhos que abordam a sua utilização e seu custo na triagem sorológica para HTLV-1/2.

As prevalências regionais, procedimentos laboratoriais (manual ou automatizado) e a sensibilidade e especificidade do teste e *kit* utilizados, são alguns fatores que exercem influência direta no uso de *pool* de soros na triagem sorológica. Todos esses fatores devem ser avaliados e testados para que se saiba qual é o número de amostras que pode compor o *pool* (Andersson et al., 2001; Dow et al., 2001). Em Taiwan *pool* de 50 amostras é utilizado para realizar a triagem para HTLV, já no Reino Unido, *pool* de 48 amostras tem sido utilizado (Chang et al., 2002; Davison et al., 2009).

Curiosamente, no Reino Unido, até o inicio dos anos 2000, a triagem para HTLV-1/2 não era realizada em bancos de sangue, ela só passou a ser usada após um estudo que avaliou a possibilidade de se utilizar a estratégia de *pool* de soros na Escócia e na Irlanda. Este estudo levou o departamento de saúde inglês a analisar e reconhecer a exequibilidade da abordagem, e em 2002, o Reino Unido passou a realizar a triagem em bancos de sangue em todos os seus países utilizando *pool* de soros (Dow et al., 2001; Davison et al., 2009).

No Brasil, essa estratégia não tem sido empregada, e trabalhos que testam o uso de *pool* de soros na triagem HTLV são inexistentes. Como o número de indivíduos a serem testados anualmente no Brasil é alto, não só

em bancos de sangue, mas em outras populações de risco, estudos que refutem ou confirmem o emprego do uso de *pool* de soros na triagem sorológica de HTLV-1/2 são necessários. Caso seja confirmada como uma estratégia exequível e econômica, a metodologia será de grande valia para diminuir custos para o SUS. Ela poderá ser aplicada na triagem e no acompanhamento de gestantes no pré-natal, no acompanhamento de pacientes com HIV/aids e nas hepatites virais, e em outras populações de risco, evitando-se assim a perpetuação desta infecção na população geral, o agravamento das infecções por HIV, HBV e HCV, e o surgimento de doentes com ATLL e HAM/TSP.

O Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz central (CIM-IAL), desde a década de 1990, vem realizando estudos sobre o diagnóstico e a vigilância de HTLV-1 e HTLV-2 e, considerando a inexistência de trabalhos que abordem a possibilidade de se utilizar *pools* de soro na triagem para HTLV-1/2 no país, decidiu realizar o presente estudo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

✓ Avaliar o desempenho do uso de *pool* de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2 e seu custo-minimização.

2.2. Objetivos específicos

✓ Propor o melhor teste imunoenzimático e a melhor diluição para a triagem de HTLV-1 e HTLV-2 em larga escala, sem perda de sensibilidade diagnóstica.

✓ Validar o uso de *pool* de soros utilizando os parâmetros descritos no documento de validação de métodos de ensaio de diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.

✓ Realizar a triagem para HTLV-1/2 em populações de risco utilizando a estratégia de *pool* de soros e comparar com os resultados obtidos com a triagem individual.

✓ Determinar custo-minimização do emprego de *pool* de soros em populações de risco para adquirir estas infecções e com diferentes taxas de prevalência.

3. Material e Métodos

3.1. Casuística

Para avaliar o emprego do uso de *pool* de soros na triagem sorológica para HTLV-1/2, primeiramente foram selecionadas e retestadas 81 amostras de soro sabidamente positivas para HTLV-1 (n=57), HTLV-2 (n=20) e para HTLV não tipado (n=4). As amostras eram provenientes de biorrepositório, e estavam armazenadas no CIM-IAL em freezer -20 °C, sob a guarda/responsabilidade de Adele Caterino de Araujo.

Nesta etapa foram utilizados dois diferentes ensaios imunoenzimáticos (EIA, do inglês *enzyme immuno assay* ou ELISA, *enzyme linked immuno sorbent assay*) na triagem: EIA Murex HTLV I+II, Diasorin, UK e GOLD ELISA HTLV-1/2, REM, SP e os testes confirmatórios de *Western blot* (WB, HTLV BLOT 2.4, MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd., Genelabs) e imunoensaio de linha (INNO-LIA HTLV I/II Score, Fujirebio, Europe N.V, Belgium). As amostras foram agrupadas de acordo com seus valores de densidade óptica (DO) em relação ao *cut-off* (ponto de corte), e separadas em: I) fortemente reagentes (DO/*cut-off* >12); II) moderadamente reagentes (DO/*cut-off* >2,0 a 12,0); III) fracamente reagentes (DO/*cut-off* = 0,9 a 2,0), tomando como base dados e a experiência do laboratório de HTLV do CIM-IAL (Jacob et al., 2009; Caterino-de-Araujo, comunicação pessoal).

Foram selecionadas as amostras que tinham volume suficiente (pelo menos 2 mL) para serem testadas nos ensaios de diluição. Foram empregados *pools* de soros de diferentes origens: amostras positivas para HIV, HBV e HCV (biorrepositório) e negativas para estes marcadores (bolsa de banco de sangue e de população sadia). Não houve amostras com volume suficiente para serem testadas no grupo fracamente reagente, aliás, das 81 amostras estocadas, apenas uma tinha este perfil; assim foram selecionadas amostras do grupo moderadamente reagentes que

apresentaram os menores valores de DO/*cut-off* como sendo as amostras com valores de DO/*cut-off* mais baixos [DO/*cut-off* de 2,1 (HTLV-1) e 3,7 (HTLV-2) no GOLD ELISA e 6,7 (HTLV-1) e 7,15 (HTLV-2) no EIA Murex].

Posteriormente, novas amostras foram selecionadas para serem testadas nos ensaios de validação (amostras com pelo menos 1,5 mL). Essas amostras foram empregadas em: *pools* contendo amostras positivas para HIV, HBV e HCV (biorrepositório), contendo tripla infecção (HIV, HBV e HCV), e em *pools* contendo amostras negativas (bolsa de banco de sangue e população sadia). Assim como na etapa anterior, amostras do grupo moderadamente reagente com os menores valores de DO/*cut-off* foram selecionadas representando amostras com DO/*cut-off* baixos [DO/*cut-off* de 5,4 e 5,5 (HTLV-1) e 5,6 e 6,5 (HTLV-2) no EIA Murex]. Os *pools* foram preparados em volume final de 2 mL (400 µL de cada amostra).

3.1.1. Populações de risco

Para avaliar a eficiência e o custo-minimização da estratégia de *pool* de soros em populações de risco, 2.000 amostras de soro/plasma de pacientes com hepatites virais B e C que haviam sido triadas individualmente (Caterino-de-Araujo et al., 2020), foram testadas; destas, 1.300 soropositivas para HBV, e 700 soropositivas para HCV. Estas amostras eram provenientes de serviços de saúde que fornecem atendimento a pacientes com hepatites virais em São Paulo, sendo enviadas ao laboratório de Hepatites Virais do Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo, para a determinação de CV no período de junho de 2015 a junho de 2016.

Também foram utilizadas amostras de plasma de 625 pacientes com HIV/aids do município de Tubarão, sul de Santa Catarina, que foram encaminhadas ao IAL para determinação da prevalência de infecção por HTLV-1/2 neste estado (Marcon et al., 2019), uma vez que ele foi o que apresentou a menor prevalência em doadores de sangue (Catalan-Soares et

al., 2005). As amostras foram coletadas no período de outubro de 2016 a julho de 2017 e se encontravam armazenadas em biorrepositório.

3.2. Métodos

3.2.1. Triagem sorológica

A triagem sorológica foi realizada pela detecção de anticorpos específicos anti-HTLV-1/2 utilizando os *kits* comerciais EIA Murex HTLV I+II (Diasorin) e GOLD ELISA HTLV I+II (REM). Ambos os *kits* são EIA de 3° geração, que utilizam o método sanduiche. Resumidamente os testes contém em suas placas microcavidades revestidas com antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos de HTLV-1 e HTLV-2. Caso existam anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 nas amostras de soro/plasma, forma-se um complexo antígeno-anticorpo. Esse complexo é reconhecido pelos mesmos antígenos conjugados com uma enzima capaz de reagir com um cromógeno. Um substrato cromogênico é adicionado, e na presença de reatividade, desenvolve-se um produto final colorido; a reação é bloqueada por adição de ácido clorídrico (GOLD ELISA) ou Ácido sulfúrico (Murex).

Todas as reações e cálculos foram realizados seguindo as instruções dos fabricantes. Para o cálculo do *cut-off*, foi utilizada a média de três controles negativos mais o fator de correção determinado pelo fabricante; no *kit* Murex o fator de correção é de 0,2, enquanto no GOLD ELISA é de 0,25. A amostra foi considerada positiva, quando a sua relação DO/*cut-off* apresentava um valor maior ou igual a 1,0. Valores de DO/*cut-off* 10% acima ou abaixo de 1,0 foram consideradas inconclusivas (*borderline* ou zona cinza) e submetidas juntamente às reagentes ao teste confirmatório de WB e INNO-LIA. As amostras que apresentaram uma relação DO/*cut-off* menor que 0,9 foram consideradas não reagentes.

3.2.2. Testes confirmatórios

3.2.2.1. *Western blot* (WB)

As amostras reagentes e *borderline* nos testes de triagem foram submetidas ao teste confirmatório WB usando o *kit* HTLV BLOT 2.4, MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd., Genelabs. O teste se baseia na identificação de anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 a partir de antígenos transferidos e adsorvidos em fitas de nitrocelulose. Estas fitas contêm um controle interno de reação (anti-Ig humana), proteínas recombinantes dos envelopes de HTLV-1 (rgp46-I ou MTA-1) e HTLV-2 (rgp46-II ou K55), proteínas do lisado viral de HTLV-1, e proteína recombinante transmembrana comum ao HTLV-1 e HTLV-2 (GD21). Na presença de anticorpos no soro/plasma há ligação com essas proteínas, que conseguem ser visualizadas a partir de reação ocorrida com a adição de conjugado e substrato (**Figura 4**). A reação é interrompida pela adição de água destilada. As reações e a interpretação dos resultados foram realizadas seguindo as instruções do fabricante.

Para a leitura dos resultados, foi observada primeiramente, a banda controle, caso visível, ela indica a presença de imunoglobulinas humanas. Foram considerados soros positivos para:

HTLV: quando houve reatividade para as proteínas p24, p19 e GD21.
HTLV-1: reatividade para a proteína p19 com ou sem a p24, GD21 e rgp46-I.
HTLV-2: reatividade para a proteína p24 com ou sem a p19, GD21 e rgp46-II.
Negativo: nenhuma reatividade para as proteínas específicas dos HTLV.
Indeterminado: reatividade com bandas que não preencheram os critérios de positividade para HTLV-1, HTLV-2 ou HTLV.

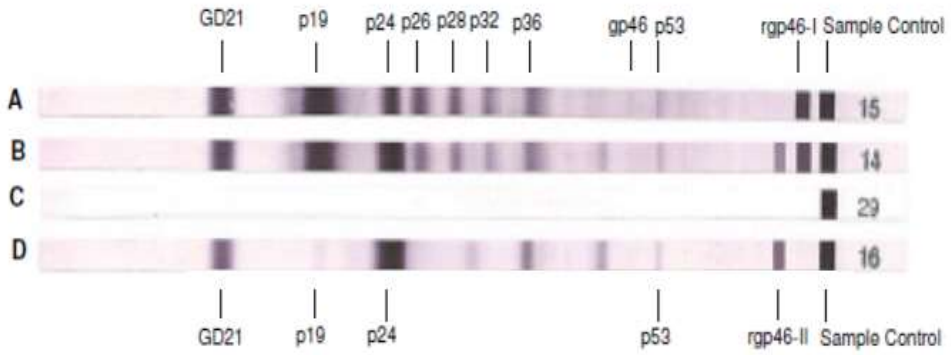

Figura 4. Perfil de bandas apresentado no teste *Western blot* (HTLV BLOT 2.4).

Fonte: adaptado da Bula HTLV BLOT 2.4 MP Biomedicals.

Legenda: A) Controle reativo para HTLV-1; B) Controle reativo para HTLV-1 e HTLV-2; C) Controle não reativo; D) Controle reativo para HTLV-2.

3.2.2.2. INNO-LIA

As amostras com perfil indeterminado, ou HTLV não tipado pelo WB, foram submetidas ao INNO-LIA HTLV I/II Score (Fujirebio, Europe N.V, Belgium). O *kit* é um imunoensaio de linha (Line Immunoassay - LIA) que confirma a presença de anticorpos contra HTLV-1/2 em amostras de soro ou plasma, a partir de peptídeos sintéticos e proteínas recombinantes adsorvidos em tiras de nylon; o *kit* também possui em suas tiras, antígenos específicos para HTLV-1 e HTLV-2, o que permite não só a identificação, mas também a discriminação entre os dois tipos virais.

O INNO-LIA também conta com quatro bandas controle, que permitem a validação do ensaio, são elas: *background control* (estreptavidina), *control* 3+ (direcionado aos anticorpos humanos de todas as classes, e controle de adição de amostra), *control* 1+ (IgG humano), e *control* +/- *cut-off*, este determina o "ponto de corte", a partir de sua observação pode-se confirmar a presença ou ausência das bandas confirmatórias e discriminatórias, estas bandas são consideradas reativas

apenas quando apresentam uma intensidade de cor ≥ a intensidade observada na banda *cut-off* (**Figura 5**).

As reações e a interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente foram observadas as bandas confirmatórias (p19 I/II, gag p24 I/II, env gp46 I/II, env gp21 I/II), a amostra é considerada positiva para HTLV quando apresenta reatividade para ao menos duas dessas bandas, sendo uma delas obrigatoriamente a gp21 I/II, ou reatividade para três bandas; quando a amostra reage com duas bandas, mas não com a gp21 I/II, ou quando reage apenas com a gp21 I/II, o resultado é considerado indeterminado; quando há apenas uma banda (p19 I/II, ou gag p24 I/II, ou env gp46 I/II), ou nenhuma banda, o teste é considerado negativo.

Posteriormente, foram observadas as bandas discriminatórias (gp46-I, gag p19-I, env gp46-II); a amostra é considerada positiva para HTLV-1 quando há reatividade com as bandas gp46-I e gag p19-I, e positiva para HTLV-2 quando há reatividade com a banda gp46-II, no caso de reatividade com as três bandas, se a somatória da intensidade de cor de gp46-I e gag p19-I for maior que a intensidade de cor de gp46-II, a amostra é considerada positiva para HTLV-1, caso essa intensidade seja menor que gp46-II, a amostra é positiva para HTLV-2.

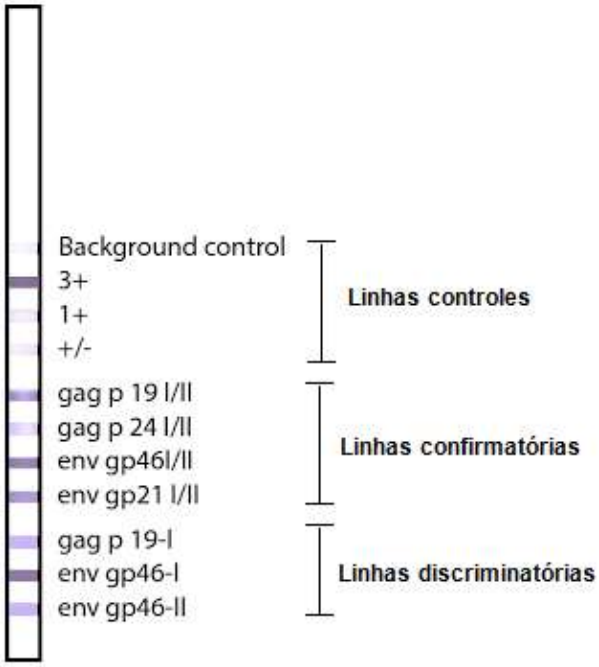

Figura 5. Ilustração da disposição das bandas apresentadas no ensaio INNO-LIA (INNO-LIA HTLV I/II Score).

Fonte: adaptado da bula INNO-LIA HTLV I/II Score Fujirebio.

3.2.3. Exequibilidade da utilização de *pools* de soros

Usando ambos os *kits* de triagem, Murex e GOLD ELISA, as amostras sabidamente positivas para HTLV-1/2 foram diluídas em amostra de plasma de bolsa de sangue negativa para HIV, HBV, HCV e outros marcadores de transmissão sanguínea. As diluições foram realizadas na razão 2, iniciando em 1:2 até 1:64, e acrescentada as diluições 1:5, 1:10 e 1:20. As amostras que permaneceram positivas até a diluição 1:64 foram diluídas até que se perdesse a reatividade. Essa abordagem possibilitou identificar qual é o *kit* que contem o EIA de maior sensibilidade, e qual a maior diluição de soros com valores de DO/*cut-off* altos e baixos, capaz de detectar casos verdadeiramente positivos (**Figura 6**).

Após os testes de diluição, foi escolhida a melhor diluição e o *kit* mais sensível para verificar se havia perda ou aumento de reatividade em

pools contendo diferentes antígenos e/ou anticorpos de infecções virais. Para essa finalidade, as amostras foram diluídas em *pool* de soros contendo amostras soropositivas para HIV, HBV, HCV, e amostras de controle sadios, negativas para essas infecções (**Figura 7**).

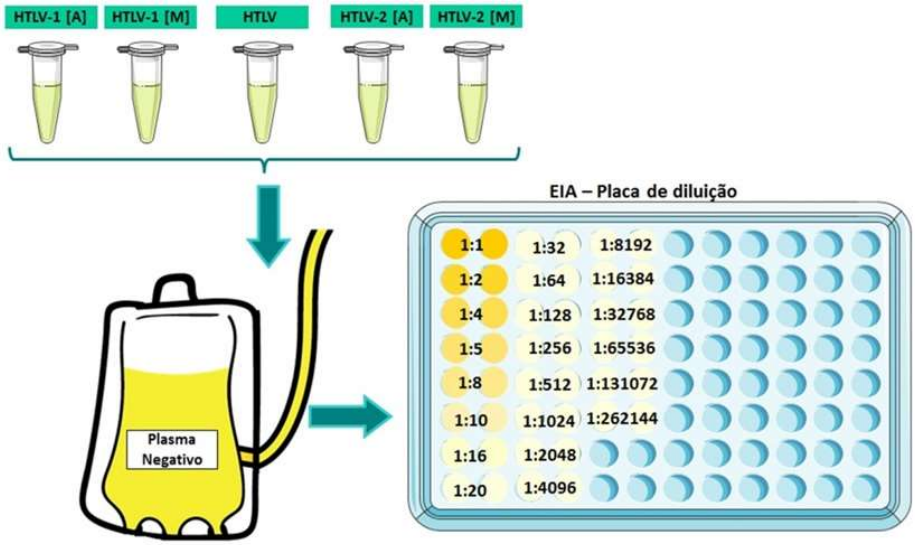

Figura 6. Esquema de diluição das cinco amostras HTLV de diferentes DO/*cut-off*, usando bolsa de plasma negativa para HIV, HBV e HCV. **Legenda:** (A), Amostra fortemente reagente; (M), Amostra moderadamente reagente.

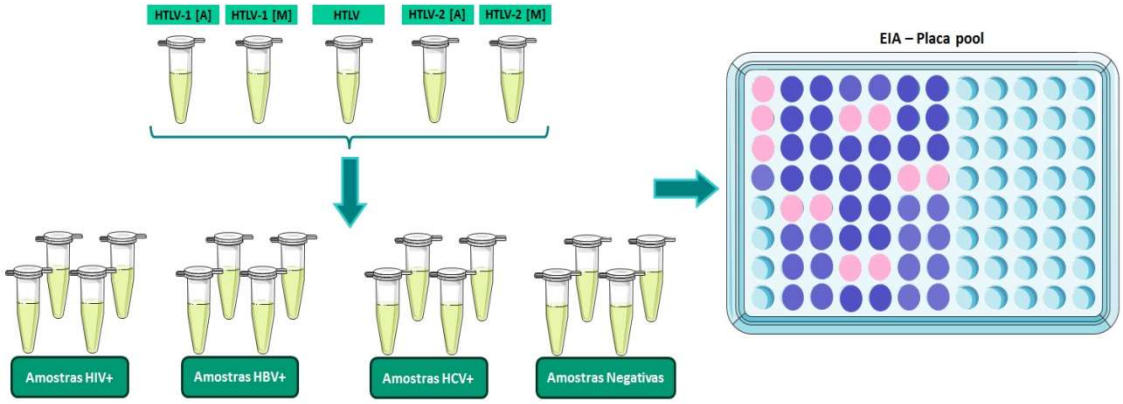

Figura 7. Esquema de preparação de *pools* usando amostras de soro positivas para HIV, HBV, HCV, e negativas para essas infecções. **Legenda:** (A), Amostra fortemente reagente; (M), Amostra moderadamente reagente.

3.2.4. Validação

Para a validação do uso de *pool* de soros na triagem sorológica de HTLV-1/2, foram utilizados o *kit* mais sensível e a maior diluição capaz de detectar casos verdadeiramente positivos. Foram empregados os parâmetros descritos no documento de validação de métodos de ensaio de diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz (P-SG-0022 Validação de métodos de ensaio de diagnóstico) documento este de utilização restrita e cópia controlada, e os descritos em literatura para a validação de ensaios de natureza qualitativa, quais sejam: acurácia, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio), sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo (Rabenau et al., 2007; Newman & Maritz, 2017).

Para serem validados, todos os requisitos devem apresentar resultados com valores próximos a 100%, ou valores iguais aos definidos pelo método referência, ou valores iguais aos descritos em literatura.

3.2.4.1. Acurácia (Exatidão)

Para análise de acurácia, diferentes amostras verdadeiramente positivas para HTLV-1/2 com diferentes perfis e graus de reatividade foram empregadas em: *pools* contendo amostras soropositivas para HIV, *pools* contendo amostras soropositivas para HBV, *pools* contendo amostras soropositivas para HCV, *pools* contendo as três infecções virais, e *pools* contendo amostras de indivíduos soronegativos para essas infecções. Amostra negativa para HTLV de controle sadio também foi utilizada para compor esses *pools*, perfazendo um total de 40 *pools* de soros analisados (35 contendo uma amostra verdadeiramente positiva, e cinco contendo amostras não reagentes para HTLV-1/2). Esses *pools* foram testados durante cinco dias. Foram calculados o coeficiente de correlação Kappa, e os valores de exatidão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, de acordo com Kawamura (2002).

3.2.4.2. Precisão intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaio (reprodutibilidade)

Na precisão intra-ensaio sete *pools* foram analisados em triplicata durante cinco dias consecutivos: dois *pools* contendo amostras não reagentes para HTLV-1/2, quatro *pools* contendo amostras moderadamente reagentes para HTLV-1 ou HTLV-2, e um *pool* contendo amostra HTLV não tipado.

Os cálculos de precisão intra-ensaio foram realizados por análise intra-dia e inter-dias. Para a precisão inter-ensaio, seis *pools* foram analisados em duplicata por três analistas diferentes (cinco *pools* contendo uma amostra verdadeiramente positiva e um *pool* contendo amostras não reagentes para HTLV-1/2), e comparados os resultados obtidos por cada analista. Os cálculos de precisão foram realizados segundo Newman & Maritz (2017) e determinado o coeficiente de correlação Kappa.

3.2.5. Análise de custo

Partindo do pressuposto que o desempenho da triagem individual para HTLV-1/2 deve ser equivalente à triagem utilizando *pool* de soros foi realizada uma análise de custo-minimização, que consiste em uma avaliação econômica em saúde que se propõe a comparar duas intervenções que possuem os mesmos resultados (Rudmik & Drummond, 2013).

Há que se destacar, no entanto, que a redução de custo na triagem sorológica para HTLV-1/2 utilizando a estratégia de *pool*s de soros é proporcional ao número de soros que compõem o *pool* e a prevalência da infecção na população em estudo, assim o custo-minimização foi calculado em diferentes populações de risco (pacientes com hepatites virais B e C e com HIV/aids).

Para o cálculo de custo-minimização foi considerado o valor de seis reais (R$ 6,00) por teste imunoenzimático em amostra individual ou em *pool*, com base em cotação de preços do *kit* realizada em maio de 2019.

A **Figura 8** apresenta as etapas e amostras utilizadas na estratégia de *pool* de soros aplicada para a triagem de infecção por HTLV-1/2.

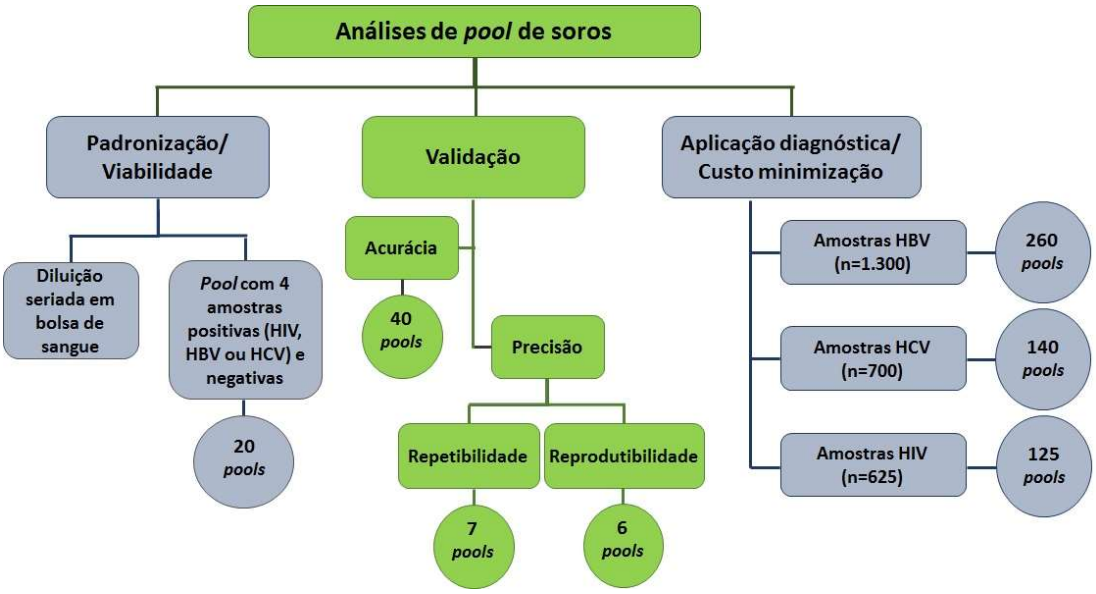

Figura 8. Fluxograma de etapas e amostras utilizadas na estratégia de *pool* de soros aplicada para a triagem de infecção por HTLV-1/2

3.2.6. Análise dos resultados

Foi constituído um banco de dados no programa Excel para Windows contendo todos os resultados dos testes sorológicos, e calculada sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo acurácia, precisão (intra-ensaio e inter-ensaio), coeficiente de correlação Kappa e a redução de custos. Os cálculos de desvio padrão e coeficiente de variação foram realizados com o auxilio do software Graph Pad Prism Version 5.00 (Trial) 2007.

3.2.7. Aspectos éticos

Foram cumpridas todas as normas expressas na resolução n° 466 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e suas complementares. O estudo é anônimo não vinculado, portanto a identificação dos pacientes foi preservada, a confidencialidade e a privacidade das informações clínicas e laboratoriais também foram mantidas. Não houve necessidade de aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pois as amostras eram de biorrepositórios, cujos resultados foram enviados aos pacientes na data de realização do exame de sorologia para HTLV. O estudo foi aprovado pelo Comitê Científico e pela Diretoria Geral do IAL (CTC # 65J/2017), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL (parecer n° 2.548.064), e cadastrado na Plataforma Brasil (CAAE 80902317.0.0000.0059). As amostras usadas para o cálculo de redução de custos originaram-se dos projetos aprovados CTC # 21I/2016, CAAE 55837316.0.0000.0059 (Hepatites virais B e C) e CTC # 45K/2018, CAAE 96885118.6.3001.0059 (HIV/aids).

3.2.8. Limitações do estudo

O estudo foi realizado com os *kits* mais comumente empregados na rotina diagnóstica do CIM-IAL, não sendo possível a comparação com outros ensaios sorológicos disponíveis no mercado nacional. Ainda, não foi possível testar amostras com DO/*cut-off* baixas.

3.2.9. Conflito de interesse

Não houve conflito de interesse com as empresas fornecedoras dos *kits* empregados na pesquisa, tampouco com os fabricantes.

4. Resultados

4.1. Avaliação do número de amostras para compor o *pool* e do melhor *kit*

Na triagem das amostras sabidamente positivas para HTLV-1, HTLV-2 e HTLV não tipado, o *kit* Murex se mostrou mais sensível em comparação ao GOLD ELISA, resultando em valores mais altos de DO/*cut-off* em todas as amostras analisadas separadamente (sem diluição). Nos testes de diluição seriada em amostra de plasma de bolsa de sangue negativo para HIV, HBV e HCV, o *kit* Murex possibilitou uma maior diluição das amostras em todos os grupos de estudo. Em ambos os *kits*, as amostras fortemente reagentes foram as que puderam ser mais diluídas antes de perderem a sua reatividade. Nas amostras moderadamente reagentes, a maior diluição sem perda de sensibilidade foi de 1:5 no *kit* Murex, e de apenas 1:2 no GOLD ELISA, independentemente de ser HTLV-1 ou HTLV-2 (**Tabela 1**).

Tendo em vista os resultados obtidos com a diluição das amostras em bolsa de sangue, procedeu-se nova análise usando *pool* de soros positivos para HIV, HBV, HCV e controles negativos para estas infecções virais, usando nesta etapa apenas o *kit* que apresentou a melhor sensibilidade (Murex), e a maior diluição capaz de detectar os casos verdadeiramente positivos (1:5). Nesses *pools,* todas as amostras permaneceram reagentes, mostrando que no uso da estratégia, não há perda de especificidade resultante de reatividade cruzada, e apesar da relação DO/*cut-off* diminuir nas amostras moderadamente reagentes, também não há perda de sensibilidade analítica (**Tabela 2**).

Tabela 1. Resultados de maior diluição de soros com DO/*cut-off* fortemente e moderadamente reagentes, capaz de detectar casos verdadeiramente positivos para HTLV-1 e HTLV-2, utilizando os *kits* Murex e GOLD ELISA na triagem de HTLV-1/2.

Amostra	Murex DO/*Cut-off* 1:1	GOLD ELISA DO/*Cut-off* 1:1	Murex		GOLD ELISA	
			Diluição*	DO/*Cut-off*	Diluição*	DO/*Cut-off*
HTLV-1 (F)	13,35	9,6	1:65.536	1,59	1:8.192	1,93
HTLV-1 (M)	6,7	3,7	1:5	1,14	1:4	1,89
HTLV-2 (F)	13,41	9,6	1:16.384	1,04	1:2.048	1,06
HTLV-2 (M)	7,15	2,1	1:10	1,02	1:2	1,03
HTLV	12,94	8,6	1:128	1,77	1:32	1,81

Legenda: (F), Amostra fortemente reagente; (M), Amostra moderadamente reagente. *Diluição realizada com soro de bolsa de sangue negativa para todos os marcadores.

Tabela 2. Resultados da triagem de infecção por HTLV-1/2 usando amostras de soros com DO/*Cut-off* fortemente e moderadamente reagentes, sem diluição e diluídas em *pool* de cinco soros HIV, HBV ou HCV positivos e negativos, usando o *kit* Murex.

Amostra	1:1	HIV*	HBV*	HCV*	Negativo*
HTLV-1 (F)	13,35	13,08	13,11	13,22	13,11
HTLV-1 (M)	6,7	1,48	1,53	2,09	1,86
HTLV-2 (F)	13,41	13,05	13,02	13,24	13,21
HTLV-2 (M)	7,15	2,43	2,13	2,83	2,21
HTLV	12,94	12,46	11,8	12,45	11,33

Legenda: (F), Amostra fortemente reagente; (M), Amostra moderadamente reagente. **Pool* contendo cinco amostras de soro.

4.2. Validação do uso de *pool* de soros

4.2.1. Cálculo de acurácia (exatidão)

Na análise de acurácia do uso de *pool* de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2, todos os 35 *pools* que continham amostras verdadeiramente positivas para HTLV-1/2 resultaram reagentes nos cinco dias testados, ademais, todos os cinco *pools* compostos por amostras não reagentes para HTLV-1/2 resultaram negativos em todos os dias. Assim, os cálculos de exatidão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram de 100% para todos os parâmetros avaliados (coeficiente de correlação Kappa = 1) (**Figura 9**).

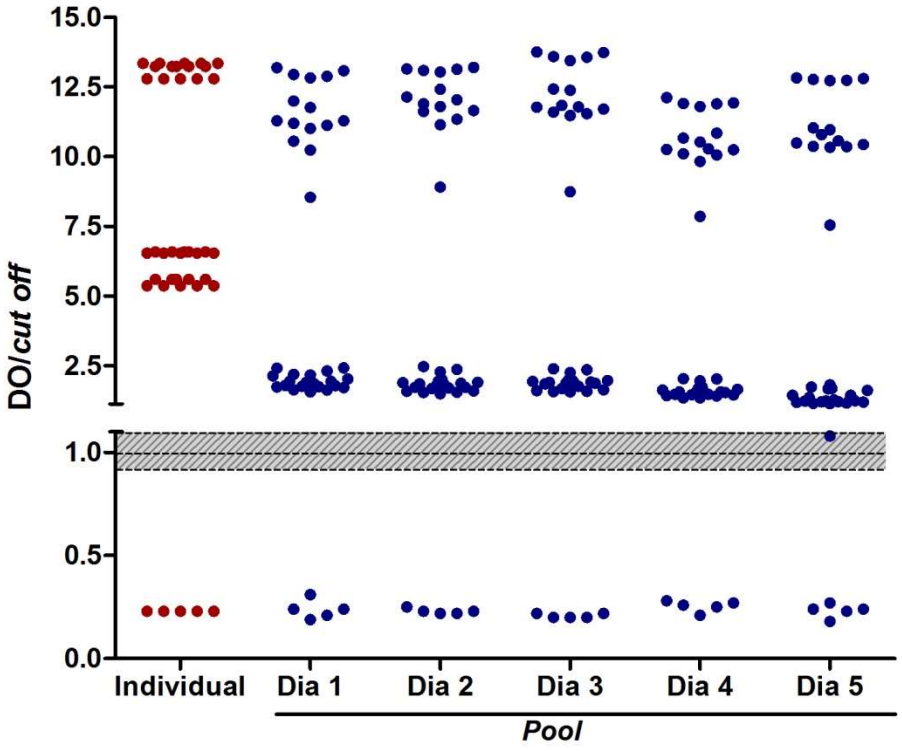

Figura 9. Valores de DO/*cut-off* obtidos com os 40 *pools* de soros testados para a infecção por HTLV-1/2 em cinco dias consecutivos para a determinação de acurácia.

4.2.2. Cálculo de precisão intra-ensaio (repetibilidade)

Nos testes de repetibilidade, todos os *pools* contendo amostras verdadeiramente positivas para HTLV-1/2 resultaram reagentes nas triplicatas, em todos os dias, e nenhum *pool* contendo amostra verdadeiramente negativa resultou positivo, logo, na precisão intra-ensaio, quando calculadas a precisão intra-dia e inter-dias, ambas resultaram em precisão de 100%. Levando em consideração os cinco dias, o coeficiente de variação foi de 6,46% a 16,13%; o *pool* que apresentou o maior coeficiente de variação continha uma amostra moderadamente reagente para HTLV-2 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resultados da análise de precisão intra-ensaio (repetibilidade) para validação do uso de *pool* de soros na triagem sorológica para HTLV-1/2.

Repetibilidade (intra- e inter-dias)									
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Dia 1**			**Média$_{D1}$**	**DP$_{D1}$**	**CV$_{D1}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,40	1,30	1,37	1,36	0,05	3,95
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,69	1,86	1,73	1,76	0,09	5,32
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	11,77	12,21	11,82	11,93	0,24	2,01
P-04	**Negativo**	**Negativa**	**0,23**	0,22	0,21	0,23	0,22	0,01	3,64
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,22	0,21	0,26	0,23	0,03	12,28
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	1,55	1,58	1,58	1,57	0,02	1,25
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,81	1,68	1,64	1,71	0,09	5,23
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/Cut-off - Dia 2**			**Média$_{D2}$**	**DP$_{D2}$**	**CV$_{D2}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,59	1,53	1,50	1,54	0,05	3,01
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,94	1,82	1,91	1,89	0,06	3,30
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,72	10,74	11,03	10,83	0,17	1,61
P-04	**Negativo**	**Negativa**	**0,23**	0,21	0,26	0,22	0,23	0,03	13,08
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,20	0,21	0,23	0,21	0,02	7,39
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	1,68	1,42	1,40	1,50	0,16	10,47
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,68	1,58	1,59	1,62	0,06	3,49
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Dia 3**			**Média$_{D3}$**	**DP$_{D3}$**	**CV$_{D3}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,50	1,35	1,36	1,40	0,08	5,93
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,67	1,78	1,74	1,73	0,06	3,19
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,28	10,21	10,29	10,26	0,04	0,42
P-04	**Negativo**	**Negativa**	**0,23**	0,20	0,27	0,22	0,23	0,03	14,87
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,21	0,20	0,27	0,23	0,04	16,06
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	1,53	1,57	1,53	1,54	0,03	1,65
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,98	1,80	1,64	1,81	0,17	9,42
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Dia 4**			**Média$_{D4}$**	**DP$_{D4}$**	**CV$_{D4}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,48	1,36	1,31	1,38	0,09	6,36
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,75	1,73	1,67	1,72	0,04	2,26
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,41	10,46	10,35	10,41	0,06	0,53
P-04	**Negativo**	**Negativa**	**0,23**	0,28	0,27	0,23	0,26	0,03	10,69
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,23	0,21	0,21	0,22	0,01	3,83
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	1,44	1,47	1,38	1,43	0,04	3,13
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,72	1,54	1,29	1,52	0,21	14,01
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Dia 5**			**Média$_{D5}$**	**DP$_{D5}$**	**CV$_{D5}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,28	1,14	1,15	1,19	0,08	6,60
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,58	1,60	1,55	1,58	0,03	1,60
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,22	10,13	10,00	10,12	0,11	1,12
P-04	**Negativo**	**Negativa**	**0,23**	0,27	0,26	0,25	0,26	0,01	5,48
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,20	0,21	0,21	0,21	0,01	2,65
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	1,26	1,26	1,23	1,25	0,01	0,99
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,23	1,15	1,13	1,17	0,05	4,42
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**Média$_{T}$**			**DP$_{T}$**	**CV$_{T}$ %**	
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,37			0,13	9,55	
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,74			0,12	6,70	
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,71			0,69	6,46	
P-04	**Negativo**	**Negativa**	**0,23**	0,24			0,03	11,44	
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,22			0,02	9,51	
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	1,46			0,13	9,22	
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,56			0,25	16,13	

Legenda: (M), Amostra moderadamente reagente; P, *pool*; MIX, *pool* contendo amostras HIV, HBV e HCV soropositivas e controle sadio; DP, Desvio Padrão; CV,Coeficiente de variação; T, Total.

4.2.3. Cálculo de precisão inter-ensaio (reprodutibilidade)

Quanto aos *pools* submetidos ao teste de reprodutibilidade, nenhum deles apresentou resultado falso negativo ou falso positivo, não havendo discordância entre os resultados obtidos pelos três analistas, fazendo com que a precisão inter-ensaio do uso de *pool* de soros também resultasse em um valor de 100% (coeficiente de correlação Kappa = 1). Quando os resultados obtidos por cada analista foram comparados, entre as amostras positivas o coeficiente de variação ficou entre 4,74% a 8,37% (**Tabela 4**).

Tabela 4. Resultados da análise de precisão inter-ensaio (reprodutibilidade) para validação do uso de *pool* de soros na triagem sorológica para HTLV-1/2.

Reprodutibilidade								
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Analista 1**		**Média$_{A1}$**	**DP$_{A1}$**	**CV$_{A1}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,32	1,28	1,30	0,03	2,18
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,44	1,39	1,42	0,04	2,50
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	11,17	11,10	11,14	0,05	0,44
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,20	0,20	0,20	0,00	0,00
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	2,53	2,55	2,54	0,01	0,56
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,37	1,26	1,32	0,08	5,91
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Analista 2**		**Média$_{A2}$**	**DP$_{A2}$**	**CV$_{A2}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,57	1,52	1,55	0,04	2,29
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,58	1,57	1,58	0,01	0,45
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	11,50	11,32	11,41	0,13	1,12
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,26	0,23	0,25	0,02	8,66
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	2,81	2,79	2,80	0,01	0,51
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,53	1,48	1,51	0,04	2,35
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**DO/*Cut-off* - Analista 3**		**Média$_{A3}$**	**DP$_{A3}$**	**CV$_{A3}$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,34	1,37	1,36	0,02	1,57
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,47	1,35	1,41	0,08	6,02
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,21	10,41	10,31	0,14	1,37
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,29	0,30	0,30	0,01	2,4
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	2,58	2,44	2,51	0,10	3,94
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,38	1,37	1,38	0,01	0,51
ID *Pool*	**Amostra**	**Conteúdo**	**DO/*Cut-off***	**Média$_T$**		**DP$_T$**		**CV$_T$ %**
P-01	**HTLV-1 [M1]**	**Negativa**	**5,36**	1,40		0,12		8,37
P-02	**HTLV-1 [M2]**	**Negativa**	**6,54**	1,47		0,09		6,38
P-03	**HTLV**	**Negativa**	**12,79**	10,95		0,52		4,74
P-05	**Negativo**	**MIX**	**0,23**	0,25		0,04		17,70
P-06	**HTLV-2 [M1]**	**Negativa**	**6,58**	2,62		0,15		5,72
P-07	**HTLV-2 [M2]**	**Negativa**	**5,6**	1,40		0,09		6,79

Legenda: (M), Amostra moderadamente reagente; P, *Pool*; MIX, *Pool* contendo amostras HIV, HBV e HCV soropositivas e controle sadio; DP,Desvio Padrão; CV, Coeficiente de variação; T, Total.

4.3. Cálculo de redução de custos (custo-minimização)

4.3.1. Hepatites Virais

Para análise de custo-minimização, primeiramente as 2000 amostras de pacientes com hepatites virais foram triadas individualmente utilizando o *kit* Murex. Nesta triagem, 55 amostras resultaram reagentes, sendo 26 no grupo HBV, e 29 no grupo HCV. Quando submetidas aos testes confirmatórios, duas amostras que reagiram positivamente na triagem resultaram negativas e uma indeterminada. No total, 52 amostras confirmaram infecção por HTLV: 26 HTLV-1 (nove no grupo HBV e 17 no grupo HCV); 26 HTLV-2 (15 no grupo HBV e 11 no grupo HCV). Duas amostras HBV que resultaram HTLV não tipadas pelo WB, confirmaram infecção pelo HTLV-2 no INNO-LIA. A prevalência HTLV-1/2 encontrada no grupo HBV foi de 1,9% (0,7% HTLV-1 e 1,2% HTLV-2), e no grupo HCV 4,0% (2,4% HTLV-1, 1,6% HTLV-2) (Caterino-de-Araujo et al., 2020). Posteriormente, no presente estudo, essas amostras foram submetidas à triagem sorológica utilizando *pool* de cinco soros e o *kit* Murex.

4.3.1.1. Hepatite B

As 1.300 amostras de soro dos pacientes infectados com hepatite B foram agrupadas em 260 *pools* de forma sequencial, destes, 25 foram reagentes; quando abertos e avaliados individualmente, um desses *pools* continha duas amostras positivas, perfazendo um total de 26 amostras positivas para HTLV-1/2. Os resultados obtidos com o *pool* de soros corroboraram os obtidos na análise individual, resultando em 100% de concordância. Assim, com o uso da estratégia de *pool* de soros, houve uma economia de 70,4% na triagem para infecção HTLV-1/2 nesta população (**Figura 10**).

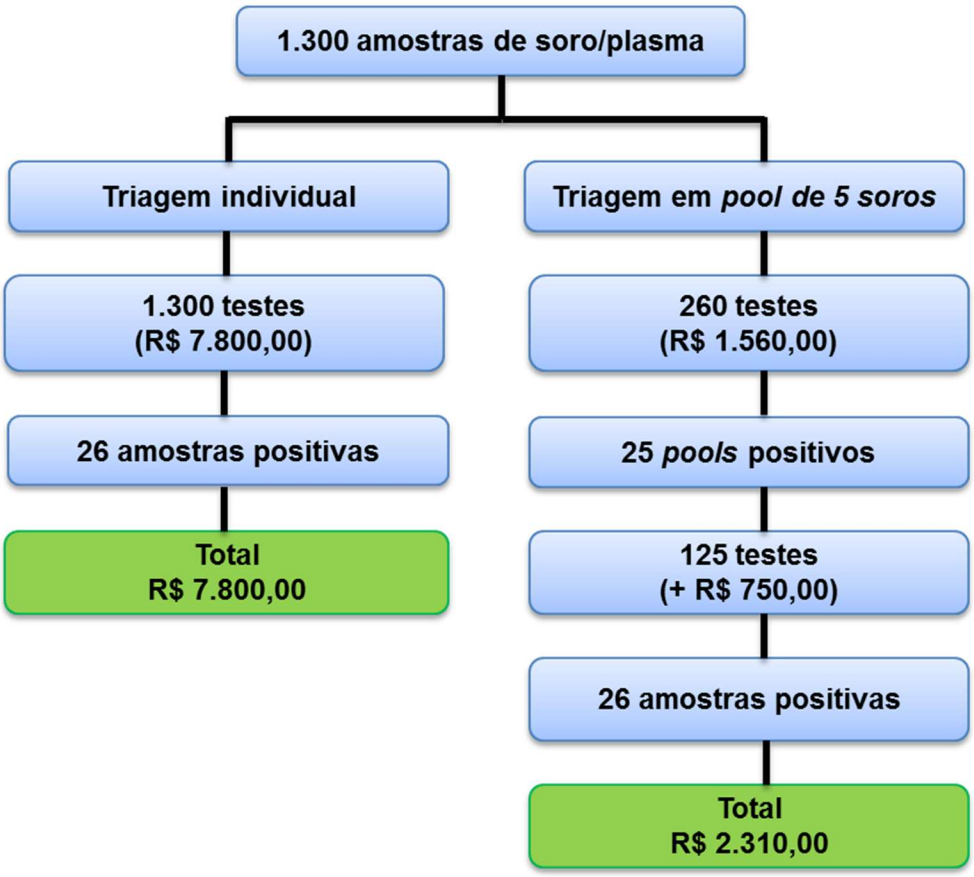

Figura 10. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HBV, utilizando a triagem individual e a triagem com *pool* de cinco soros.

4.3.1.2. Hepatite C

No grupo dos pacientes com hepatite C, as 700 amostras de soro foram agrupadas sequencialmente em 140 *pools*, e destes, 27 *pools* resultaram reagentes para HTLV-1/2. Quando as amostras de soro dos 27 *pools* foram analisadas individualmente, dois *pools* continham duas amostras positivas, o que resultou em 29 amostras positivas para HTLV-1/2. Também em casos de hepatite C, os resultados obtidos com o *pool* de soros mostraram 100% de concordância em relação aos obtidos em análise

individual. Assim, o uso do *pool* de soros na triagem, reduziu o custo da triagem em 60,7% neste grupo de pacientes (**Figura 11**).

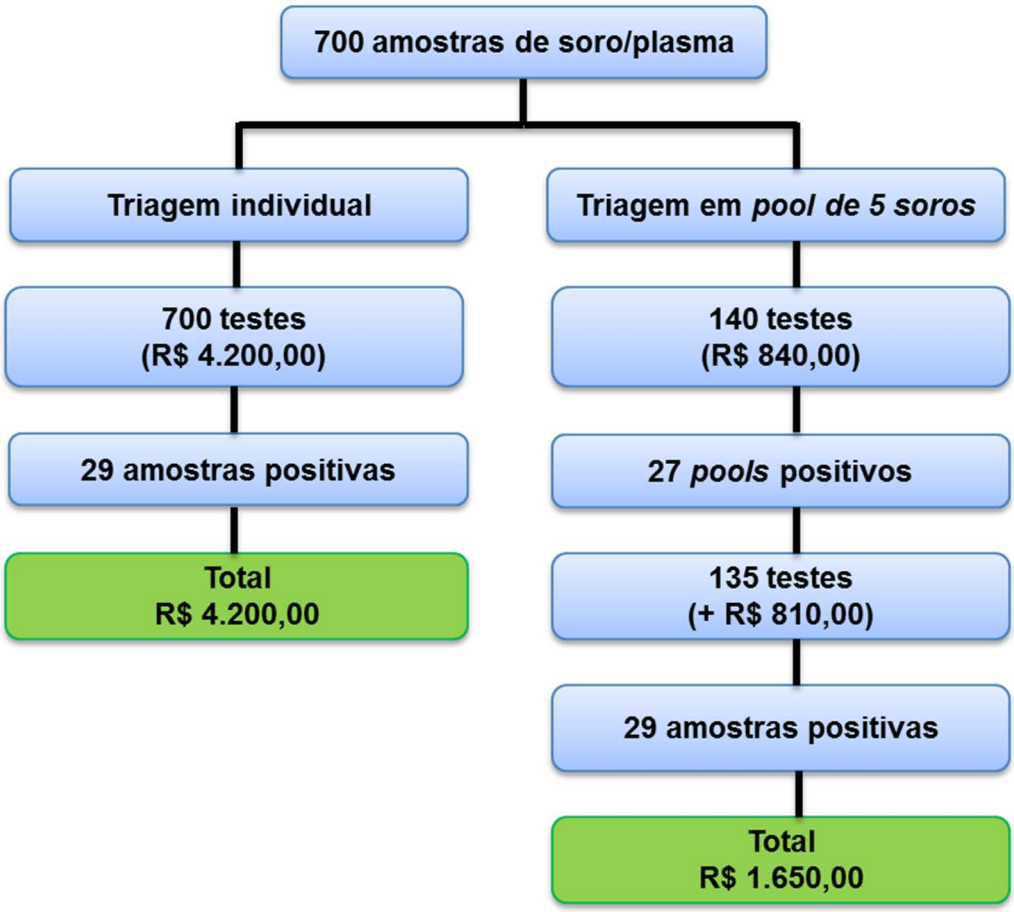

Figura 11. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HCV, utilizando a triagem individual e a triagem com *pool* de cinco soros.

4.3.2. HIV/aids

Também para a análise de redução de custo, foram utilizadas mais 625 amostras de plasma de pacientes com HIV/aids que haviam sido avaliadas individualmente quanto a presença de anticorpos anti-HTLV-1/2 utilizando o *kit* GOLD ELISA. Na triagem, oito amostras resultaram reagentes e, quando submetidas aos testes confirmatórios de WB e INNO-LIA, sete (1.1%) confirmaram infecção por HTLV: três HTLV-1 (0,48%), três

HTLV-2 (0,48%) e uma HTLV não tipada (0,16%) (Marcon et al., 2019). Quando analisadas utilizando a estratégia de *pool* de soros, primeiramente elas foram testadas com o mesmo *kit* GOLD ELISA em *pool* de dois soros. Foram testados 312 *pools* e mais um soro individualmente; houve oito *pools* reagentes para HTLV-1/2, sendo um com resultado *borderline*. Nenhum *pool* continha mais de uma amostra positiva quando testado individualmente. Com o uso da estratégia de *pool* de dois soros, houve uma economia de 47,4% na triagem nesta população (**Figura 12**). Há que se destacar que o *pool* que resultou em valor de DO/*cut-off borderline*, quando aberto, continha uma amostra de soro que na análise individual resultou em DO/*cut-off* = 1,3, porém na análise pelo WB e INNO-LIA esta amostra resultou padrão Indeterminado com as seguintes bandas: WB (rgp46II e GD21) e INNO-LIA (rgp21 I/II). Portanto, os resultados obtidos com o *pool* de dois soros usando o *kit* GOLD ELISA, concordaram com os da análise individual.

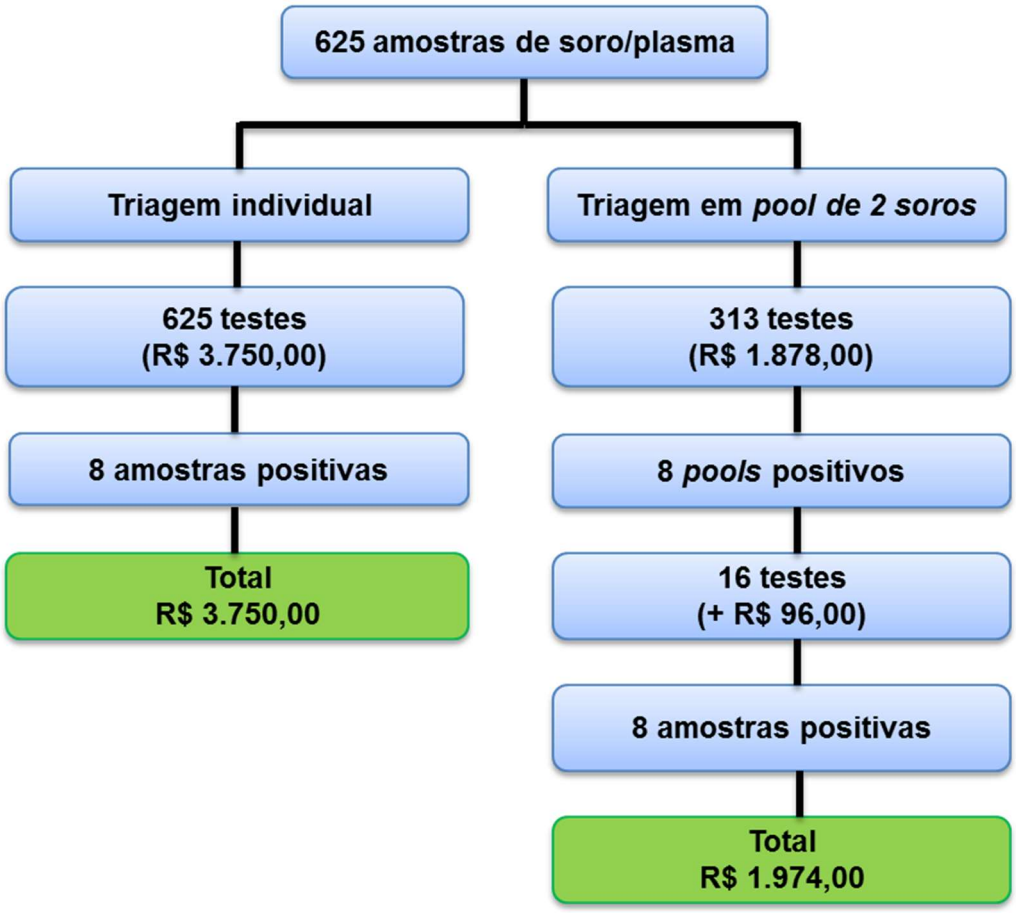

Figura 12. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HIV, utilizando o *kit* GOLD ELISA na triagem individual e na triagem com *pool* de dois soros.

Posteriormente, foi utilizado o *kit* Murex em *pool* de cinco soros. As 625 amostras foram testadas em 125 *pools* de soros; houve oito *pools* que resultaram reagentes para HTLV-1/2 sendo um *pool* com resultado inconclusivo (abaixo da zona cinza). Quando os soros dos oito *pools* foram analisados individualmente, oito soros foram considerados reagentes, porém apenas sete confirmaram infecção por HTLV pelo WB e INNO-LIA, os mesmos soros descritos anteriormente. Digno de nota, o soro responsável pelo resultado inconclusivo na triagem em *pool* de soros e que não confirmou infecção por HTLV-1/2, resultou em DO/*cut-off* = 3,0.

Em resumo, utilizando a estratégia de *pool* de cinco soros e o *kit* Murex, houve uma economia de 73,6% na triagem de infecção por HTLV-1/2 (**Figura 13**). Assim, os resultados obtidos na triagem de HTLV-1/2 em população HIV/aids mostraram concordância entre as duas estratégias de *pool* de soros empregadas, e corroboraram os resultados obtidos na análise individual dos soros.

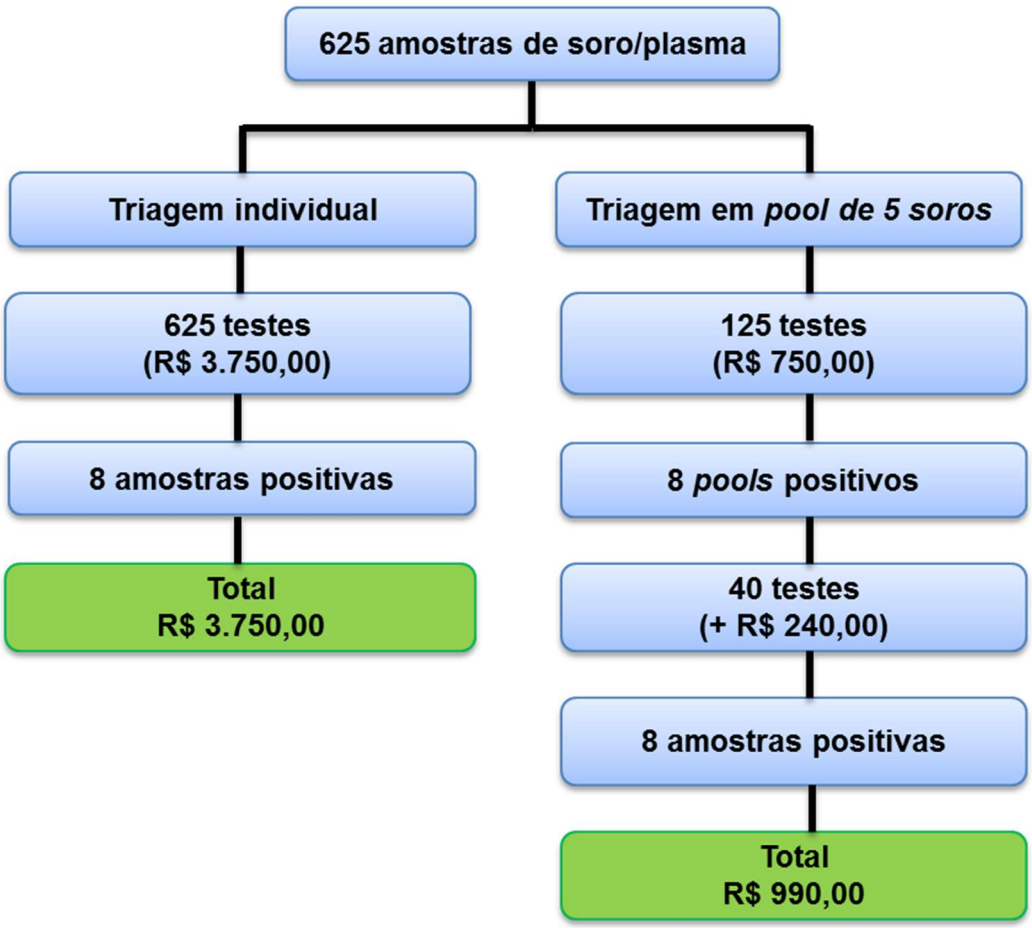

Figura 13. Custo da triagem para HTLV-1/2 em amostras de pacientes infectados por HIV, utilizando o *kit* Murex na triagem individual e na triagem com *pool* de cinco soros.

Há que se destacar que todos os resultados obtidos foram publicados (Silva et al., 2020).

5. Discussão

A triagem sorológica para HTLV-1/2 pode ser realizada por ensaios imunoenzimáticos, teste de aglutinação de partículas, ou ensaio de quimioluminescência. No Brasil, os testes mais utilizados são os EIA, embora nos últimos anos, dependendo da demanda, venham sendo substituídos pela quimioluminescência, principalmente em bancos de sangue (Brasil, Ministério da Saúde, 2013; da Silva Brito et al., 2018).

O desempenho dos testes de triagem depende de diversos fatores, como por exemplo, da composição antigênica e do formato dos *kits.* Com o decorrer dos anos, foram produzidos testes de diferentes gerações, composições e formatos, e outrora apesar deles serem menos sensíveis e específicos, houve uma melhora significativa. Cerca de dez anos atrás, nenhum *kit* disponível no mercado nacional apresentava 100% de sensibilidade e especificidade, e isto motivou pesquisadores a desenvolverem estudos em busca de estratégias, algoritmos, e combinações de testes e *kits*, que proporcionassem maior sensibilidade e especificidade na triagem de HTLV-1/2 em diferentes populações, e com o menor custo (Jacob et al., 2007, 2008, 2009; Berini et al., 2008; Caterino-de-Araujo, 2009a). Atualmente, os *kits* disponíveis no mercado brasileiro apresentam 100% de sensibilidade quando empregados em população de bancos de sangue e população geral (da Silva Brito et al., 2018), e próximo a este valor quando aplicado em população infectada por HIV-1 (Barreto-Damião et al., 2014; Campos et al., 2017).

O uso de *pool* de soros na triagem sorológica de outro retrovírus humano, o HIV, tem sido descrito em diversos trabalhos; a estratégia diminuiu os custos da triagem, principalmente em populações com baixa prevalência, e em comparação ao desempenho da triagem individual, apresentou os mesmos resultados de sensibilidade e especificidade, tendo sido recomendado pela OMS nas décadas de 1980 e 1990 (Emmanuel et al.,

1988; Cahoon-Young et al., 1989; Kline et al., 1989; Monzon et al., 1992; Parry et al., 1993). Apesar da preocupação demonstrada por vários pesquisadores em todo o mundo em relação à eficiência e custos da triagem de infecção por HTLV-1/2, trabalhos utilizando *pool* de soros para estes retrovírus são raros e, no Brasil, inexistentes, o que motivou a realização do presente trabalho.

Para testar esta abordagem, foram escolhidos os dois *kits* de triagem para HTLV-1/2 comumente utilizados no CIM-IAL, Murex e GOLD ELISA; ambos são EIA que empregam sistema manual, e que apresentam diferentes sensibilidades. Nas analises realizadas, o *kit* Murex foi o mais sensível em todos os grupos testados, sendo consequentemente o mais apropriado para ser usado em *pool*. Esse resultado corrobora descrições prévias, onde o *kit* Murex também foi mais sensível em comparação ao GOLD ELISA, apresentando maior valor de DO/*cut-off* quando amostras de soro de população infectada pelo HIV/aids foram testadas pelos dois *kits* (Barreto-Damião et al., 2014; Campos et al, 2017). Por exemplo, em 1.608 amostras de soros provenientes de pacientes infectados pelo HIV testados para HTLV-1/2, o *kit* Murex apresentou 100% de sensibilidade, conseguindo detectar todos os casos verdadeiramente positivos. Quando as mesmas amostras foram submetidas ao GOLD ELISA, houve um caso positivo para HTLV-2 que resultou ELISA *borderline* (DO/*cut-off* = 0,9), e que não seria identificado como positivo caso não fosse considerada a zona cinza; a mesma amostra apresentou uma DO/c*ut-off* de 2,4 no *kit* Murex (Barreto-Damião et al., 2014).

Ao expandir a casuística para 2.991 amostras, mais uma vez o *kit* Murex foi o mais sensível, sendo capaz de identificar duas amostras que resultaram não reagentes pelo GOLD ELISA (DO/*cut-off* = 0,2 para amostra HTLV-2 positiva e DO/*cut-off* = 0,1 para HTLV não tipado), enquanto no *kit* Murex as mesmas amostras resultaram DO/*cut-off* 1,1 e 0,9, respectivamente (Campos et al., 2017). Nestes estudos, caso a zona cinza não fosse levada em consideração, três amostras verdadeiramente positivas

para o HTLV não teriam sido identificadas, o que mostra a importância de submeter amostras com resultados *borderline* na triagem, aos testes confirmatórios. Há que se ressaltar que nestes trabalhos foi utilizada uma zona cinza de 10% e as amostras de soro/plasma eram provenientes de pacientes com HIV/aids (Barreto-Damião et al., 2014; Campos et al., 2017).

Um estudo recente avaliou o desempenho de quatro *kits* disponíveis comercialmente no Brasil para a triagem sorológica de HTLV-1/2; três ELISA (GOLD ELISA, Murex e SYM Solution, o último da empresa Symbiosis Diagnostica LTDA, Brazil), e um de quimioluminescência (Architect rHTLV-1/2, ABBOTT Diagnostics). Na triagem em amostras confirmadamente positivas pelo WB, o GOLD ELISA foi o que apresentou o melhor desempenho, sendo o mais especifico dentre os quatro, já o Murex foi o *kit* com a menor especificidade (92%). Em contrapartida, ao se comparar o desempenho em amostras com padrão indeterminado à análise pelo WB, mas verdadeiramente positivas para HTLV-1 pela PCR, o GOLD ELISA foi o menos especifico e o Murex e o SYM solution foram os que apresentaram os melhores resultados. Ademais, dentre os ELISA, o Murex foi o *kit* que detectou os maiores valores de DO/*cut-off* (média de 16,8), corroborando os resultados do presente estudo. Ainda, levando em consideração todos os testes, a quimioluminescência (Architect) foi o que detectou os valores mais altos, com uma média de unidades relativas de luz das amostras em relação ao *cut-off* (S/*cut-off*) de 90,6 (da Silva Brito et al., 2018). Em suma, os autores concluíram que todos os *kits* disponíveis no mercado nacional são altamente sensíveis (100% de sensibilidade) e específicos, e podem ser utilizados com segurança na triagem sorológica para HTLV-1/2 em bancos de sangue e ambulatórios de HTLV. Entretanto, levando em consideração os testes estatísticos realizados, o Architect foi o que apresentou o melhor desempenho, seguido do GOLD ELISA, que deve ser utilizado em locais onde a quimioluminescência não pode ser implantada. De destaque foi o fato de que apesar de o GOLD ELISA ser o *kit* com o melhor desempenho neste trabalho, o Murex continua sendo o *kit* de maior sensibilidade, pois resultou reagente em amostras que eram indeterminadas à análise pelo WB, mas

que foram posteriormente confirmadas como sendo HTLV-1 positivas pela PCR (da Silva Brito et al., 2018).

Há que se ressaltar que, para se determinar o melhor *kit* a ser utilizado, deve-se levar em consideração não só o seu desempenho, mas também outros fatores, como por exemplo, o objetivo de sua utilização, a casuística a ser estudada, e as condições de cada laboratório. Assim, tomando como base o objetivo do presente trabalho, a casuística enviada ao IAL de São Paulo para análise, e os resultados observados no presente estudo e em outros estudos, o *kit* Murex comprovou ser o mais adequado (Barreto-Damião et al., 2014; Campos et al., 2017; da Silva Brito et al., 2018; Silva et al., 2020).

Como era de se esperar, no trabalho de da Silva Brito e colaboradores o Architect foi o *kit* que mostrou os valores mais altos de reatividade, e seu desempenho fez com que ele fosse usado e recomendado na triagem para HTLV-1/2 em diferentes populações (Qiu et al,. 2008; Kapprell et al., 2010; da Silva Brito et al., 2018). Entretanto, o Architect parece possuir uma sensibilidade excessiva, o que pode resultar em muitas amostras com resultados falso-positivos. Por exemplo, um estudo recente envolvendo 12.250 amostras de plasma/soro mostrou que entre as 271 amostras que mostraram valores de S/*cut-off* entre 1 e 4, nenhuma delas foi confirmada como HTLV positiva, resultando em um valor preditivo positivo de 0% neste grupo (Tosswill & Taylor, 2018). Medeiros e colaboradores (2018) também realizaram um estudo onde 643 gestantes foram testadas utilizando o Architect; destas, quatro (0,6%) foram positivas na quimioluminescência, mas apenas duas resultaram HTLV positivas no teste confirmatório. Tal qual os dados descritos por Tosswill & Taylor (2018), as duas amostras que não foram confirmadas possuíam S/*cut-off* de 1,30 e 2,50, enquanto nas amostras confirmadas as S/*cut-off* foram de 78,27 e 137,50 (Medeiros et al., 2018).

Tomando como base a experiência prévia dos pesquisadores do CIM-IAL com os *kits* EIA de 3ª geração (Ortho e Murex) quando foram analisados os valores de DO*/cut-off* em relação ao resultado final de WB numa curva ROC (do inglês *receive operating characteristics*), foi verificado que, em se aumentado o valor da DO/*cut-off* estabelecido pelo fabricante de 1,0 para 2,1, haveria um aumento de especificidade do teste de 7,8% (Jacob et al., 2009). Isto poderia, em tese, ser aplicado ao ensaio de quimioluminescência, para valores de S/*cut-off* abaixo de 4. Estes deveriam ser analisados com cautela, pois poderiam advir de reatividade cruzada/inespecífica ou exagerada sensibilidade do teste. Outra questão seria como estes soros se comportariam quando analisados em *pool,* já que a diluição poderia diminuir a inespecificidade da reação (Parry et al., 1993).

Apesar de serem apenas suposições e especulações, que devem ser confirmadas em estudos usando plataformas de quimioluminescência e *pool* de soros, o resultado obtido no presente estudo com uma amostra do grupo HIV/aids corrobora a hipótese de diminuição de inespecificidade com a diluição do soro. Esta amostra que na análise individual resultou DO/*cut-off* = 3,0 no *kit* Murex, quando analisada em *pool* de cinco soros, apresentou valor abaixo da zona cinza e não confirmou infecção por HTLV-1/2 no WB e INNO-LIA. Digno de nota, no CIM-IAL o teste de quimioluminescência não é utilizado para a triagem sorológica, e entre os *kits* disponíveis (Murex e GOLD ELISA), o Murex mostrou melhor desempenho.

Concordando com o presente estudo, o Murex tem sido o *kit* de escolha para ser utilizado com *pool* de soros também por pesquisadores de outros países. Por exemplo, no Reino Unido quando a triagem para HTLV em bancos de sangue passou a ser realizada em *pool* de soros, o *kit* de escolha foi o Murex, levando em consideração sua alta sensibilidade analítica demonstrada em estudos comparativos com diferentes *kits* (Davison et al., 2009).

Um estudo desenvolvido na Suécia se propôs a analisar a possibilidade de se utilizar a estratégia de *pool* de soros. Os autores analisaram quatro *kits* de triagem de diferentes formatos e composição antigênica em amostras positivas para HTLV-1 e HTLV-2 de diversas partes do mundo, os *kits* empregados foram: (i) HTLV-I/II 3.0 EIA, Genelabs Diagnostics, que consiste em um ELISA no formato indireto e que contém como antígenos proteínas recombinantes de HTLV-1/2; (ii) HTLV-I/HTLV-II Ab Capture ELISA, Ortho Diagnostics, um ELISA sanduiche contendo proteínas recombinantes; (iii) Murex que também se utiliza do formato sanduiche, e (iv) Serodia HTLV-I, um teste de aglutinação de partículas recobertas com lisado viral de HTLV-1. Neste estudo o EIA Murex também foi o teste com o melhor desempenho, tanto nas amostras positivas para HTLV-1, quanto nas amostras positivas para HTLV-2. Os autores também discutiram que a diluição 1:5 foi a recomendada para a confecção dos *pool*s, por ser uma diluição capaz de detectar todos os casos verdadeiramente positivos com segurança, o que corrobora os achados do presente estudo (Andersson et al., 2001; Silva et al., 2020).

Na diluição em *pools* as amostras problemáticas são as com valores de DO/*cut-off* baixa. Monzon e colaboradores na década de 1990 relataram preocupação em utilizar a técnica de *pool* de soros em amostras de pacientes HIV positivos com baixo título de anticorpos, pois ao diluírem as amostras com esse grau de reatividade, como por exemplo, amostras de pacientes em soroconversão, não foram detectados anticorpos e os resultados foram falsos negativos. Levando isso em consideração, esses pesquisadores analisaram amostras com baixo, médio, e alto título de anticorpos em diferentes diluições. Eles observaram que houve perda de sensibilidade nas amostras com baixo título de anticorpos a partir da diluição 1:10, sendo a diluição 1:5 a máxima capaz de detectar todos os casos verdadeiramente positivos neste grupo. Já nas amostras com títulos médios e altos de anticorpos, todas foram identificadas nas diluições testadas, o que mostra que as amostras problemáticas são de fato as com baixo título de anticorpos, e que a diluição 1:5 deve ser utilizada quando se trabalha com

diferentes amostras de diferentes graus de reatividade, ou quando não se conhece as características das amostras a serem testadas, a fim de se garantir uma sensibilidade de 100% no uso de *pool* (Monzon et al., 1992). Estes dados concordam com os obtidos no presente estudo.

Dentre as amostras testadas no presente trabalho, apenas uma havia resultado em DO/*cut-off* baixa (<2,00), sendo que esta amostra não possuía volume suficiente para ser avaliada. Desde 1998 até o presente momento, mais de 9.000 soros foram testados para HTLV-1/2 pelo CIM-IAL; em todos esses anos, foram encontradas pouquíssimas amostras com DO/*cut-off* baixa e que confirmaram infecção por HTLV-1/2, o que reforça a escassez de amostras confirmadas com esse grau de reatividade, e impossibilita que testes envolvendo essas amostras sejam realizados (informação pessoal, Adele Caterino-de-Araujo).

As amostras moderadamente reagentes foram testadas como sendo as amostras com DO/*cut-off* mais baixos, e como já discutido, os resultados encontrados corroboram os descritos em literatura para amostras com baixos títulos de anticorpos. Em relação às amostras fortemente reagentes, estas não parecem ser problemáticas quando testadas em *pool,* podendo ser diluídas com segurança utilizando ambos os *kits*, uma vez que começaram a apresentar perda de reatividade no Murex a partir das diluições 1:65.536 e 1:16.384 para HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente, e a partir das diluições 1:8.192 para HTLV-1, e 1:2.048 para HTLV-2 no GOLD ELISA (Silva et al., 2020).

Chang e colaboradores, em um estudo piloto com 19 amostras confirmadas como positivas para HTLV com DO/*cut-off* >3,00, também realizaram testes de diluição utilizando o *kit* Murex para verificar a eficácia da utilização de *pool* de soros. Neste estudo houve perda de sensibilidade a partir da diluição 1:64. Tendo em vista os resultados promissores observados, procedeu-se uma nova análise, onde mais de 135.000 amostras provenientes de banco de sangue de Taiwan, foram testadas utilizando *pool*

de 50 soros. Entretanto, quando estas amostras com diferentes DO foram submetidas ao *pool* houve perda de sensibilidade (77,3%), com amostras resultando em falso-negativas a partir da diluição 1:8. Os autores concluíram que para se detectarem todas as amostras verdadeiramente positivas com diferentes graus de reatividade, a diluição 1:5 deve ser utilizada, o que também corrobora os resultados encontrados no presente estudo (Silva et al., 2020), a recomendação da OMS e os dados descritos em literatura para o uso de *pool* de soros em amostras suspeitas de infecção por HIV (Chang et al., 2002).

A maioria dos estudos realizados no CIM-IAL mostrou que por compartilharem as mesmas vias de transmissão, os pacientes infectados por HTLV-1/2 em São Paulo, também possuem a infecção por HIV e/ou HBV e/ou HCV (De-Araujo et al., 1994; Morimoto et al., 2005; Jacob et al., 2007; Caterino-de-Araujo et al., 2015; Campos et al., 2017, 2019; Caterino-de-Araujo et al., 2018, 2020). Portanto, a estratégia de triagem para HTLV-1/2 a ser utilizada, precisa não só ser sensível, mas também específica, para que o resultado seja fidedigno, e que na presença de diferentes infecções virais não haja reatividade cruzada de anticorpos, ou seja, que anticorpos direcionados a outros agentes infeciosos resultem em reações falso-positivas.

Neste sentido, foram realizados no presente estudo testes com amostras de soros compondo o *pool* de diferentes infecções virais. Os resultados obtidos mostram que mesmo em *pool* contendo amostras de soro de pacientes com a infecção HIV, HBV e HCV, as amostras de pacientes infectados por HTLV-1 e HTLV-2 foram identificadas, com uma especificidade analítica de 100%, o que mostra que a técnica pode ser utilizada em nosso país onde estes vírus são endêmicos, e também pode ser aplicada em populações de risco onde normalmente essas infecções coexistem, como por exemplo, UDI, HSH, profissionais do sexo e outros (Bautista et al., 2009; Soares et al., 2014; Caterino-de-Araujo et al., 2015; Koech et al., 2018; Paulino-Ramirez et al., 2019; Silva et al., 2020).

A validação de ensaios diagnósticos tem como objetivo, a partir de cálculos e testes específicos, verificar se um equipamento, procedimento ou método está funcionando corretamente, ou ainda, verificar se os requisitos especificados para sua utilização são de fato atendidos (Newman & Maritz, 2017). Logo, para garantir que os resultados obtidos na utilização de *pools* de soros na triagem sorológica para HTLV-1/2 são resultados realmente fidedignos e aceitáveis, a técnica foi submetida a um processo de validação. O IAL possui o seu próprio documento com o objetivo de estabelecer e padronizar diretrizes para quem deseja realizar a validação de métodos de ensaio de diagnóstico (P-SG-0022). No presente estudo, foram testados todos os parâmetros descritos neste documento (restrito aos funcionários do IAL) para a validação de ensaios diagnósticos de natureza qualitativa.

Nos testes de validação, utilizando *pools* contendo amostras verdadeiramente positivas com diferentes graus de reatividade, os valores obtidos de sensibilidade e especificidade diagnósticas foram de 100%; há de se destacar que, além da sensibilidade e especificidade diagnóstica, a sensibilidade e especificidade analítica também foram testadas previamente, com os testes sendo realizados juntamente aos ensaios de diluição, e como já discutidos, ambos também apresentaram resultados promissores utilizando o *kit* e a diluição proposta (*kit* Murex e diluição 1:5). Ou seja, os resultados sugerem que independente da composição do *pool*, o uso da estratégia não apresenta reatividade cruzada, e amostras verdadeiramente positivas submetidas ao *pool* não são negativadas quanto diluídas (utilizando a diluição 1:5) (Silva et al., 2020). Além disso, não foram encontrados resultados falsos positivos ou falsos negativos, pelo contrário, o uso de *pools* pode diminuir a inespecificidade da reação, como ocorreu em uma amostra do grupo HIV/aids.

Deste modo, a sensibilidade encontrada se equipara a sensibilidade descrita em trabalhos recentes que analisam o uso do *kit* Murex na triagem individual, e a especificidade é maior do que a especificidade descrita por outros pesquisadores. Existe diferença entre o tamanho das casuísticas e

entre as populações estudadas em cada trabalho, o que justifica as diferentes taxas de especificidade utilizando o mesmo *kit,* entretanto, todos eles relatam um valor próximo a 100% (Barreto-Damião et al., 2014; Campos et al., 2015; da Silva Brito et al., 2018).

Os valores preditivos positivos e negativos obtidos foram de 100%. Ademais, a acurácia da utilização de *pools* de soros também foi de 100%; todos esses achados reforçam o poder que a estratégia possui em distinguir entre amostras verdadeiramente positivas e verdadeiramente negativas. Ou seja, ela é plenamente capaz de identificar corretamente a presença ou ausência da infecção, característica essa que é desejável, e confirma o uso de *pools* como sendo extremamente indicado para ser utilizado na triagem sorológica para HTLV-1/2.

O uso de *pools* de soros também se mostrou 100% preciso em todos os cenários testados, e 100% reprodutível, ou seja, utilizando o *kit* e a diluição proposta, os resultados podem ser replicados e reproduzidos por outros laboratórios (Silva et al., 2020).

Levando em consideração a divergência existente na literatura em relação aos testes que devem ser realizados na validação, e considerando as particularidades dos ensaios realizados em laboratórios de virologia, Newman e Maritz (2017) desenvolveram um trabalho com objetivo de estabelecer diretrizes e padronizar o processo de validação nestes laboratórios. De acordo com este trabalho, nos testes de precisão intra- e inter-ensaio, para que os resultados sejam aceitáveis e para que a metodologia possa ser validada, os coeficientes de variações apresentados devem ser menores de 35%, ou estarem de acordo com o estabelecido pelo fabricante do *kit* utilizado (Newman & Maritz, 2017). De certo, no presente trabalho, todos os resultados de precisão, tanto nos testes de repetibilidade, quanto nos de reprodutibilidade, os coeficientes de variação obtidos foram menores que 35% (Silva et al., 2020).

Na bula do *kit* Murex não existe especificação a respeito dos valores aceitáveis para a sua validação, contudo, quando o teste de precisão foi realizado pelo fabricante utilizando amostras moderadamente e fracamente reagentes em triagem individual, os coeficientes de variação de precisão intra-ensaio variaram de 4,3% a 9,3%, o que corrobora em parte com os resultados obtidos no presente trabalho, com exceção de um *pool* contendo uma amostra moderadamente reagente para HTLV-2 que resultou em um coeficiente de variação de 16,1%. No entanto, o fabricante do *kit* não especifica se as amostras utilizadas para realizar esse teste eram positivas para HTLV-1 ou para HTLV-2, e também não detalha como os testes de precisão foram realizados. Ainda, as amostras testadas possuem graus de reatividade que diferem das amostras utilizadas no presente trabalho e não foram testadas em *pools*, logo, os resultados apresentados na bula não servem como parâmetro de comparação, pois é justificável que se encontre divergências quando comparados aos resultados descritos no presente estudo (Bula *Kit* Murex HTLV-I+II).

Digno de nota sabe-se que amostras com reatividade para HTLV-2 são as mais problemáticas no diagnóstico de HTLV-1/2 (Caterino-de-Araujo, 2009b; Campos et al., 2015; Caterino-de-Araujo et al., 2015). O fato do *pool* com o maior coeficiente de variação conter uma amostra verdadeiramente positiva para HTLV-2 com resultado de DO/*cut-off* baixo, pode ser responsável pela alta variação observada. Todavia, não houve negativação desse *pool* quando foi submetido ao teste de precisão, e seu coeficiente de variação foi menor que 35%, ou seja, mesmo apresentando a maior variação, o *pool* não interferiu no processo de validação.

Para a precisão inter-ensaio, os resultados do coeficiente de variação obtidos pelo fabricante do *kit* Murex variam de 5,6% a 11,9%, no presente trabalho, a variação encontrada nas amostras verdadeiramente positivas foi menor (4,7% a 8,4%), o que faz com que os valores encontrados estejam dentro dos valores considerados como aceitáveis pelo fabricante (Bula *Kit* Murex HTLV-I+II). O maior coeficiente de variação nessa

etapa foi de uma amostra verdadeiramente negativa (17,7%), entretanto, o valor está dentro do parâmetro estipulado em literatura (Newman & Maritz, 2017). Em suma, o uso de *pool* de soros para a triagem sorológica de HTLV-1/2 pôde ser validado, pois os valores obtidos estão de acordo com os resultados descritos como aceitáveis pelo P-SG-0022 e pela literatura, e corroboram em parte os resultados obtidos em ensaio de validação realizado pelo fabricante do *kit* utilizado.

Após a validação, para verificar a eficiência e a magnitude da redução de custos ao se utilizar a estratégia de *pool* de soros em amostras já triadas individualmente e cujos resultados eram conhecidos, foi realizado estudo com casuística de populações com hepatites virais B e C e com a infecção HIV/aids, disponíveis para a testagem no CIM-IAL (Marcon et al., 2019; Caterino-de-Araujo et al., 2020).

A princípio pensou-se em realizar uma análise de custo-efetividade por ser uma metodologia comumente utilizada para comparar duas (ou mais) estratégias de intervenção em saúde para prevenção, diagnóstico, ou tratamento. Porém, o estudo de custo-efetividade é realizado usando uma metodologia complexa, onde os custos são confrontados com desfechos da prática clínica, como por exemplo, mortalidade, hospitalizações evitadas, e anos de vida ganhos (Campolina & Ciconelli, 2006; Brasil, Ministério da Saúde, 2008; Secoli et al., 2010).

Existe apenas um estudo recente em HTLV-1/2 que realiza, de fato, analise de custo-efetividade. Malik e Taylor (2019) realizaram esse estudo e desenvolveram um modelo para estimar sob quais condições a introdução da triagem HTLV-1 no acompanhamento de gestantes no pré-natal no Reino Unido seria custo-efetiva. A medida de efetividade utilizada neste trabalho foi o QALY (do inglês *quality-adjusted life years*), e para realizar os cálculos de custo-efetividade no modelo desenvolvido, foi levada em consideração a prevalência de infecção por HTLV-1 no Reino Unido, as diferentes taxas de risco para desenvolver HAM/TSP e ATLL descritas em literatura, o custo

anual para se tratar um paciente com HAM/TSP e ATLL, o risco da transmissão vertical e o padrão de amamentação em diferentes populações, além do custo da triagem usando *pool* de soros e a triagem individual, entre outros dados importantes. Neste estudo ficou provado que a estratégia de utilização de *pool* de soros foi a de melhor custo-efetividade, em todos os cenários presentes no modelo desenvolvido (Malik & Taylor, 2019).

Há que se destacar que no presente estudo, não foram analisados desfechos clínicos, e tomando como base que as duas abordagens apresentam medidas de efetividade (sensibilidade) semelhantes, foi realizada uma análise de custo-minimização. De fato, os resultados obtidos com as amostras testadas individualmente e em *pool* mostraram concordância de 100%, apresentando uma redução de custos que variou de 47,4% a 73,6%, dependendo do número de soros que compuseram o *pool* (dois ou cinco) e da prevalência de HTLV-1/2 na população de estudo (quanto menor a prevalência maior a redução de custos) (Silva et al., 2020).

Ocorre que, os poucos trabalhos publicados sobre a utilização de *pool* de soros para a triagem de infecção por HTLV-1/2, não se propuseram a analisar populações coinfectadas com outros vírus, e tampouco realizaram testes para verificar se havia possíveis interferências resultantes de reatividade cruzada; além disso, todos eles analisaram a possibilidade de se utilizar a estratégia apenas em bancos de sangue, e sequer cogitaram a sua introdução na triagem de outras populações de risco (Andersson et al., 2001; Dow et al., 2001; Chang et al., 2002). Ademais, esses estudos foram desenvolvidos no início dos anos 2000, quando a sensibilidade e o desempenho dos *kits* de triagem ainda eram limitados. Em contrapartida, o presente estudo se propôs a descrever uma abordagem mais atual e mais abrangente da utilização de *pools* na triagem de infecção por HTLV-1/2.

Por exemplo, Andersson e colaboradores (2001), ao utilizarem os *kits* disponíveis para a triagem na época, discutiram que a metodologia de *pool* de soros não deveria ser realizada na triagem para HTLV-1/2, e que

seu uso deveria se restringir a estudos de soroprevalência, pois mesmo usando a diluição 1:5, não havia garantia de que a sensibilidade dos testes não seria comprometida. Contudo, no presente trabalho foram realizados testes mais específicos, e os resultados obtidos nos ensaios iniciais de exequibilidade, e a concordância de 100% entre a triagem individual e a triagem utilizando *pool* em populações de risco, mostram que existe a possibilidade de empregar *pool*s na triagem sorológica para HTLV-1/2, sem que haja perda de sensibilidade ou especificidade diagnóstica (Andersson et al., 2001; Silva et al., 2020).

Outrossim, além de não haver perda de desempenho do *pool* quando comparado à utilização da triagem individual (coeficiente de correlação Kappa = 1), também houve uma redução de custo significativa em todas as populações de risco testadas, o que torna a sua utilização desejável, e corrobora o melhor custo-efetividade do uso de *pools* sugerido por Malik e Taylor (2019). Todos esses achados sugerem que a técnica pode ser utilizada em inquéritos epidemiológicos e na triagem em populações de risco, principalmente em países endêmicos para as infecções por HTLV e com poucos recursos financeiros (Mailk & Taylor et al., 2019).

O uso de *pools* também poderia ser utilizado na triagem sorológica para HTLV-1/2 em gestantes. Um estudo recente buscou avaliar se a gestação interferiria na produção de anticorpos específicos e na detecção de segmento proviral de HTLV-1. Foram utilizadas amostras pareadas de sangue de 21 gestantes, coletadas durante e fora do período de gestação. Os resultados obtidos mostraram que estes marcadores de diagnóstico (anticorpos e segmento proviral) não sofrem alteração durante a gestação e continuam resultando positivos. No estudo foi utilizado para a pesquisa de anticorpos o *kit* Abbott Architect rHTLV-I/II, e curiosamente, as amostras coletadas durante o período de gestação, resultaram em S/*cut-off* maiores em relação ao período pós-parto, sugerindo que a estratégia de *pool*s de soros também pode ser utilizada em amostras de gestantes infectadas por HTLV-1/2, sem alterar o desempenho do teste utilizado (Rosadas et al.,

2019). Entretanto, mais estudos se fazem necessários para confirmar esta hipótese, e para verificar como essas amostras se comportariam no *pool* quando empregadas em *kits* de triagem de sistema manual.

Em relação às hepatites virais, em 2018, o IAL de São Paulo foi pioneiro em pesquisar a infecção por HTLV-1/2 em amostras de soro/plasma de pacientes com HBV e HCV; como resultado, foram encontradas prevalências consideradas de moderada a alta nesses pacientes (1,3%, e 5,3% para HBV e HCV, respectivamente) (Caterino-de-Araujo et al., 2018). A prevalência de HTLV-1/2 de 1,3% encontrada nos pacientes infectados por HBV foi descrita como preocupante, pois apesar de aparentar ser baixa, se equiparava as prevalências encontradas em regiões consideradas endêmicas para o vírus (Catalan-Soares et al., 2005; Gessain & Cassar, 2012). No presente estudo, os pacientes infectados com HBV apresentaram uma prevalência ainda maior (1,9%); esse aumento foi observado principalmente na coinfecção HBV/HTLV-2 (0,5% no estudo anterior, e 1,2% no presente estudo), sugerindo ser o uso de drogas injetáveis o principal fator de risco para adquirir a infecção por HTLV nessa população, o que já havia sido descrito em estudos realizados anteriormente (Caterino-de-Araujo et al., 2018, 2020).

No grupo HCV observou-se um decréscimo na prevalência HTLV-1/2 em relação ao estudo anterior (5,3% no estudo anterior, e 4,0% no presente estudo), porém, a prevalência permanece alta, e continua sendo motivo de preocupação por ser maior que as prevalências descritas em populações consideradas de alto risco para adquirir a infecção, como por exemplo, HSH, e profissionais do sexo, e semelhante à prevalência encontrada em pacientes com HIV/aids de São Paulo (Bautista et al., 2009; Soares et al., 2014; Campos et al., 2017; Castro et al., 2018; Caterino-de-Araujo et al., 2018)

Ainda em relação aos pacientes infectados por hepatites virais, destaca-se a importância de se utilizar o INNO-LIA como teste confirmatório

complementar ao WB, pois ele confirmou dois casos verdadeiramente positivos para HTLV-2 que pela análise por WB haviam resultado HTLV positivos, porém não tipados. Um estudo realizado em São Paulo confirma de fato o melhor desempenho do INNO-LIA, mostrando que o *kit* se presta para resolver a maioria dos casos WB indeterminados ou não tipados. O mais interessante é que, quando o INNO-LIA foi empregado em amostras de soro com padrão inconclusivo no WB, ele mostrou melhor desempenho justamente no grupo de amostras oriundas de pacientes infectados por HBV ou HCV (Campos et al., 2020).

Em suma, as prevalências encontradas confirmam e reforçam os dados anteriormente descritos, mais uma vez dando visibilidade à infecção por HTLV-1/2 nos casos de pacientes com hepatites virais dos tipos B e C, e reforçando a importância de se realizar a triagem sorológica no acompanhamento desses pacientes, o que já tem sido sugerido, mas ainda não ocorre em nosso país (Caterino-de-Araujo et al., 2018, 2020; Campos et al., 2019). Caso a sorologia para HTLV-1/2 seja recomendada pelo MS do Brasil no acompanhamento de pacientes com hepatites virais B e C, o número de pacientes a serem testados será alto, e os custos com a triagem também, o que consequentemente poderia suscitar dúvidas a respeito da sua exequibilidade, e dos reais benefícios da sua introdução. Assim, os resultados obtidos no presente estudo mostram que a estratégia de *pool* de soros, pode reduzir em mais de 60% os custos da triagem para HTLV-1/2 em população com HBV e HCV, e que esta redução pode ser maior caso a população a ser estudada possua uma prevalência de HTLV-1/2 menor que as prevalências encontradas nas hepatites B e C (Caterino-de-Araujo et al., 2018, 2020; Silva et al., 2020).

Quanto à triagem para HTLV em pacientes infectados por HIV, foram utilizadas amostras de pacientes atendidos em Santa Catarina, estado brasileiro que reportou a menor prevalência de HTLV-1/2 em bancos de sangue (0,04%) (Catalan-Soares et al., 2005). No estado, ainda não havia estudos que se propusessem a pesquisar a infecção por HTLV-1/2 em

amostras de pacientes infectados por HIV, o que motivou a realização de um estudo investigativo na região sul de Santa Catarina. O estudo mostrou que na região circulam tanto o HTLV-1 quanto o HTLV-2 nesses pacientes, com uma prevalência de 1,1%, o que é 27,5 vezes maior que a prevalência encontrada em bancos de sangue (Marcon et al., 2019).

Inicialmente utilizando o *kit* GOLD ELISA e *pool* de dois soros na triagem nesta população, houve uma redução de custo de 47,4% em relação à triagem individual, ou seja, mesmo utilizando o *kit* com o menor desempenho, a estratégia foi capaz de detectar todos os casos verdadeiramente positivos, e ainda assim apresentou uma redução de custo expressiva. Merece notoriedade o fato de que o GOLD ELISA é um *kit* de procedência nacional, sendo o *kit* mais frequentemente adquirido por pregão eletrônico (informação pessoal, Adele Caterino-de-Araujo). Esses resultados sugerem que mesmo em laboratórios onde o *kit* Murex não esteja disponível, a estratégia de *pool* de soros ainda pode ser utilizada, podendo ser adaptada e validada aos *kits* disponíveis, e as condições de cada laboratório. Contudo, o Murex continua sendo o *kit* de ELISA recomendado, pois na mesma população infectada por HIV ele pôde ser utilizado em *pool* de cinco soros, o que resultou em uma redução de custo de 73,6% em comparação a triagem individual (Silva et al., 2020). Vale a pena ressaltar que no presente trabalho apenas o uso do *kit* Murex foi validado, e mais estudos devem ser realizados para verificar se os demais *kits* de triagem disponíveis comercialmente se prestam para serem utilizados em *pool* de soros, sendo esta junto ao fato de não terem sido testadas amostras de gestantes, as principais limitações do estudo.

Finalmente, desde 2014, o MS recomenda que a sorologia para HTLV-1/2 seja realizada ao menos uma vez no acompanhamento de pacientes com HIV, assim, a estratégia de *pool* de soros também pode ser utilizada no acompanhamento desses pacientes, o que resultaria em redução de custo para o SUS (Brasil, Ministério da Saúde, 2014; Silva et al., 2020).

6. Conclusão

- ✓ Foi possível avaliar e validar a técnica de *pool* de soros para a triagem sorológica de infecção por HTLV-1/2 e determinar seu custo-minimização em população de risco para adquirir estas viroses.

- ✓ O melhor *kit* imunoenzimático para ser empregado na técnica de *pool* de soros foi o Murex empregando cinco soros para compor o *pool* sem perda de sensibilidade e especificidade diagnóstica.

- ✓ A validação da técnica permitiu que ela fosse empregada em populações de risco (indivíduos infectados por HBV, HCV e HIV) mostrando redução de custos que variaram de 60,7% a 73,6%.

- ✓ A técnica pode ser empregada em larga escala em inquéritos epidemiológicos, no acompanhamento de pacientes com outras infecções virais e, possivelmente, em gestantes no pré-natal.

7. Referências Bibliográficas

Abad-Fernández M, Moreno A, Dronda F, Campo S, Quereda C, Casado JS, et al. Delayed liver fibrosis in HTLV-2-infected patients co-infected with HIV-1 and hepatitis C virus with suppressive antiretroviral therapy. AIDS. 2015; 29(4):401-9.

Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC, Caterino-de-Araujo A. Hepatitis C viral load in HCV-monoinfected and HCV/HIV-1-, HCV/HTLV-1/-2-, and HCV/HIV/HTLV-1/-2-co-infected patients from São Paulo, Brazil. Braz J Infect Dis. 2018; 22(2):123-8.

Andersson S, Gessain A, Taylor GP. Pooling of samples for seroepidemiological surveillance of human T-cell lymphotropic virus types I and II. Virus Res. 2001; 78(1-2):101-6.

Araujo A, Hall WW. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. Ann Neurol. 2004; 56(1):10-9.

Bahia F, Novais V, Evans J, Marchand CL, Netto E, Page K, et al. The impact of human T-cell lymphotropic virus I infection on clinical and immunologic outcomes in patients coinfected with HIV and hepatitis C virus. J Acquir Immune Defic Syndr. 2011; 57(3):202-7.

Bangham CRM, 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.

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

Bautista CT, Pando MA, Reynaga E, Marone R, Sateren WB, Montano SM, et al. Sexual practices, drug use behaviors, and prevalence of HIV, syphilis, hepatitis B and C, and HTLV-1/2 in immigrant and non-immigrant female sex workers in Argentina. J Immigr Minor Health. 2009; 11(2):99-104.

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

Beilke MA, Theall KP, Brien MO, Clayton JL, Benjamim SM, Winsor EL, et al. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfected with HIV and human T lymphotropic virus types 1 and 2. Clin Infect Dis. 2004; 39(2):256-63.

Berini CA, Pascuccio MS, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodriguez C, et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. J Virol Methods. 2008; 147(2):322-7.

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 Immune Defic Syndr. 2010; 54(3):290-6.

Bittencourt AL, Primo J, Oliveira MFP. Infecção pelo HTLV-I na infância e adolescência, transmissão vertical do HTLV-I, dermatite infecciosa

associada ao HTLV-I, HAM/TSP infanto-juvenil, ATL na infância e adolescência. J Pediatr (Rio J). 2006; 82(6):411-20.

Boa-Sorte N, Purificação A, Amorim T, Assunção L, Reis A, Galvão-Castro. Dried blood spot testing for the antenatal screening of HTLV, HIV, syphilis, toxoplasmosis and hepatitis B and C: prevalence, accuracy and operational aspects. Braz J Infect Dis. 2014; 18(6):618-24.

Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H, et al. A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis c virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. J Infect Dis. 2000; 181(1):35-41.

Braço ILJ, Sá KSG, Waqasi M, Queiroz MAF, Silva ANR, Cayres-Vallinoto, et al. High prevalence of human T lymphotropic virus 2 (HTLV-2) infection in villages of the Xikrin tribe (Kayapo), Brazilian Amazon region. BMC Infect Dis. 2019; 19(1):459.

Brasil. Ministério da Saúde. Avaliação econômica em saúde: desafios para gestão no Sistema Único de Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2008; 104p.

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

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Guia do manejo clínico do paciente com HTLV/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids – Brasília: Ministério da Saúde. 2013; 80p.

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.

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(15):2053-5.

Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. AIDS. 2009; 11(1):8-16.

Cahoon-Young B, Chandler A, Livermore T, Gaudino J, Benjamin R. Sensitivity and specificity of pooled versus individual sera in a human immunodeficiency virus antibody prevalence study. J Clin Microbiol. 1989; 27(8):1893-95.

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; 2:30.

Campolina AG, Ciconelli RM. Qualidade de vida e medidas de utilidade: parâmetros clínicos para as tomadas de decisão em saúde. Pan Am J Public Health. 2006; 19(2):128-36.

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

Campos KR, Alves FA, Lemos MF, Moreira RC, Caterino-de-Araujo A. The reasons to include the serology of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in the clinical follow-up of patients with viral hepatitis B and C in Brazil. Plos Negl Trop Dis. 2020; 14(5):e0008245.

Campos KR, Santos FLN, Da Silva Brito VS, Gonçalves NLS, Araujo THA, Galvão-Castro B, et al. Line Immunoassay for confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections in inconclusive western blot serum samples from Brazil. J Clin Microbiol. 2020; 23;58(1): e01384-19.

Cardoso DF, De Souza FV, Fonseca LAM, Duarte AJS, Casseb J. Influence of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection on laboratory parameters of patients with chronic hepatitis C virus. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2009; 51(6):325-9.

Carneiro-Proietti ABF, Amaranto-Damasio MS, Leal-Horiguchi CF, Bastos RHC, Seabra-Freitas G, Borowiak DR, et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic viruses-1/2: What we know, and what are the gaps in understanding and preventing this route of infection. J Pediatric Infect Dis Soc. 2014; 3(S1):S24-S29.

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

Castro LS, Rezende GR, Fernandes FRP, Bandeira LM, Puga MAM, Tanaka TSO, et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 infection among men who have sex with men in Central Brazil. Braz J Infect Dis. 2018; 22(6):472-6.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLVI/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. Cad Saúde Pública. 2005; 21(3):926-31.

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(1-2):150-1.

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

Caterino-de-Araujo A, Sacchi CT, Gonçalves MG, Campos KR, Magri MC, Alencar WK. Short Communication: Current prevalence and risk factors associated with human T lymphotropic virus type 1 and human T

lymphotropic virus type 2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015; 31(5):543-9.

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. 2018; 113(2):130-4.

Caterino-de-Araujo A, Campos KR, Petrucci TV, Silva RX, Lemos MF, Moreira RC. Surveillance of human retroviruses in blood samples from patients with hepatitis B and C in São Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020; 53:e20190378.

Chang CS, Wu YW, Pan YC, Chen ZY, Wang CS. Feasibility of human T-lymphotropic virus type I screening using pooled sera. J Formos Med Assoc. 2002; 101(11):775-8.

Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV). Taxonomia. 2018. [internet] [acesso em 7 junho 2019]. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/.

Cruz SM. A redução de danos no cuidado ao usuário de droga. Aberta Senad, Rio de Janeiro. 2017; 14p.

Dal Fabbro MMFG, 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. 2018; 41(2):148-51.

Da Silva Brito VS, Santos FLN, Gonçalves NLS, Araujo THA, 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.

Davison KL, Dow B, Barbara JA, Hewitt PE, Eglin R. The introduction of anti-HTLV testing of blood donations and the risk of transfusion-transmitted HTLV, UK. Transf Med. 2009; 19(1):24-34.

De-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, et al. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. Eur J Epidemiol. 1994; 10(2):165-71.

Dow BC, Munro H, Ferguson K, Buchanan I, Jarvis L, Jordan T, et al. HTLV antibody screening using mini-pools. Transf Med. 2001; 11(6):419-22.

Emmanuel JC, Basset MT, Smith HJ, Jacobs JA. Pooling of sera for human immunodeficiency virus (HIV) testing: an economical method for use in developing countries. J Clin Pathol. 1988; 41(5):582-5.

Figueiró-Filho EA, Lopes AHA, Senefonte FRA, Júnior VGS, Botelho CA, Duarte G. Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da Região Centro-Oeste do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005; 27(12):719-25.

Frutos MC, Gastaldello R, Balangero M, Remondegui C, Blanco S, Otsuki K, et al. Silent dissemination of HTLV-1 in an endemic area of Argentina. Epidemiological and molecular evidence of intrafamilial transmission. PLoS One. 2017; 12(4):e0174920.

Gallo RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. Retrovirology. 2005; 2:17.

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(8452):407-10.

Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. Front Microbiol. 2012; 3:388.

Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. Clin Microbiol Rev. 2010; 23(3):577-89.

Gotuzzo E, Moody J, Verdonck K, Cabada MM, González E, Dooren SV, et al. Frequent HTLV-1 infection in the offspring of Peruvian women with HTLV-1–associated myelopathy/tropical spastic paraparesis or strongyloidiasis. Rev Panam Salud Publica. 2007; 22(4):223-30.

Guerra AB, Siravenha LQ, Laurentino RV, Feitosa RNM, Azevedo VN, Vallinoto ACR, et al. Seroprevalence of HIV, HTLV, CMV, HBV and rubella virus infections in pregnant adolescents who received care in the city of Belém, Pará, Northern Brazil. BMC Pregnancy Childbirth. 2018; 18(1):169.

Haziot M E, Gascon MR, Assone T, Fonseca LAM, Luiz OC, Smid J, et al. Detection of clinical and neurological signs in apparently asymptomatic HTLV-1 infected carriers: Association with high proviral load. PLOS Negl Trop Dis.2019; 13(5):e0006967.

Hindawi S, Badawi M, Fouda F, Mallah B, Mallah B, Rajab H, et al. Testing for HTLV-1 and HTLV-2 among blood donors in Western Saudi Arabia: prevalence and cost considerations. Transf Med. 2018; 28(1):50-64.

Hino S, Sugiyama H, Doi H, Ishimaru T, Yamabe I, Tsuji Y, et al. Breaking the cycle of HTLV-I transmission via carrier mother's milk. Lancet. 1987; 2(8551):158-9.

Hino S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. Proc Jpn Acad, Ser. B. 2011; 87(4):152-66.

Hisada M, Maloney EM, Sawada T, Miley WJ, Palmer P, Hanchard B, et al. Virus Markers associated with vertical transmission of human T lymphotropic virus type 1 in Jamaica. Clin Infect Dis. 2002; 34(12):1551-7.

Hisada M, Chatterjee N, Zhang M, Battjes R, Goedert J. 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(6):891-7.

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

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

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

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. Science.1982; 218(4572):571-3.

Kapprell H-P, Stieler M, Oer M, Goller A, Hausmann M, Schochetman G, et al. Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II assay for blood screening and diagnosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 67(1):61-9.

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

Kishihara Y, Furusyo N, Kashiwagi K, Mitsutake A, Kashiwagi S, Hayashi J. Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. J Infect Dis. 2001; 184(9):1114-9.

Kline RL, Brothers TA, Brookmeyer R, Zeger S, Quinn TC. Evaluation of human Imunodeficiency virus seroprevalence in population surveys using pooled sera. J Clin Microbiol 1989; 27(7):1449-52.

Koech CC, Lwembe RM, Odari EO, Budambula NLM. Prevalence and associated risk factors of HTLV/HIV co-infection among people who inject drugs (PWIDs): A review. J Hum Virol Retrovirol. 2018; 6(1):1-10.

Laperche S, Worms B, Pillonel J. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. Vox Sang. 2009; 96(2):104-10.

Le Marchand C, Bahia F, Page K, Brites C. Hepatitis C virus infection and spontaneous clearance in HTLV-1 and HIV co-infected patients in Salvador, Bahia, Brazil. Brazilian J Infect Dis. 2015; 19(5):486-91.

Machado Filho ACM, Sardinha JFJ, Ponte RL, Costa EP, Silva SS, Martinez-Espinosa FE. Prevalência de infecção por HIV, HTLV, VHB e de sífilis e clamídia em gestantes numa unidade de saúde terciária na Amazônia ocidental brasileira. Rev Bras Ginecol Obstet. 2010; 32(4):176-83.

Magalhães T, Mota-Miranda AC, Alcantara LCJ, Olavarria V, Galvão-Castro B, Rios-Grassi MF. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in Northern of Brazil: Tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. J Med Virol. 2008; 80(11):2040-5.

Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: Discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. Viruses. 2011; 3(7):1074-90.

Malik B, Taylor GP. Can we reduce the incidence of adult T-cell leukaemia/lymphoma? Cost-effectiveness of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) antenatal screening in the United Kingdom. Br J Haematol. 2019; 184(6):1040-43.

Marcon CEM, Campos KR, da Silva GB, Schuelter-Trevisol F, Schlindwein AD, Trevisol DJ, et al. The first survey of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) in HIV/AIDS patients in Santa Catarina State, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2019; 61:e53.

Marr I, Davies J, Baird RW. Hepatitis B virus and human T-cell lymphotropicvirus type 1 co-infection in the Northern territory, Australia. Int J Infect Dis. 2017; 58:90-5.

Mauclère P, Afonso PV, Meertens L, Plancoulaine S, Calattini S, Froment A, et al. HTLV-2B strains, similar to those found in several Amerindian tribes, are endemic in central African Bakola Pygmies. J Infect Dis. 2011; 203(9):1316-23.

Medeiros ACM, Vidal LRR, Von Linsingen R, Ferin AN, Bessani Strapasson T, de Almeida SM, et al. Confirmatory molecular method for HTLV-1/2 infection in high-risk pregnant women. J Med Virol. 2018; 90(5):998-1001.

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.

Mello MAG, Conceição AF, Sousa SMP, Alcântara LC, Marin LJ, Raiol MRS, et al. HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. Virol J. 2014; 11(1):28.

Mendes MST, Costa MC, Costa IMC. Human T-cell lymphotropic virus-1 infection: three infected generations in the same family. Rev Soc Bras Med Trop. 2016; 49(5):660-2.

Mesquita F, Doneda D, Gandolfi D, Nemes MIB, Andrade T, Bueno R, et al. Brazilian Response to the human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome epidemic among injection drug users. Clin Infect Dis. 2003; 37(s5):S382-S385.

Mesquita F, Kral A, Reingold A, Bueno R, Trigueiros D, Araujo PJ, et al. Trends of HIV infection among injection drug users in Brazil in the 1990s: the impact of changes in patterns of drug use. J Acquir Immune Defic Syndr. 2001; 28(3):298-302.

Monteiro DLM, Taquette SR, Barmpas DBS, Rodrigues NCP, Teixeira SAM, Villela LHC, et al. Prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women living in the metropolitan area of Rio de Janeiro. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(9):e3146.

Monzon OT, Paladin FJE, Dimaandal E, Balis AM, Samsom C, Mitchell S. Relevance of antibody content and test format in HIV testing of pooled sera. AIDS.1992; 6(1):43-6.

Moreira M, Ramos A, Netto EM, 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):661-6.

Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, et al. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. AIDS Res Hum Retrovir. 2005; 21(4):256-62.

Moura AA, Mello MJG, Correia JB. Prevalence of syphilis, human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and human T-lymphotropic virus infections and coinfections during prenatal screening in an urban Northeastern Brazilian population. Int J Infect Dis. 2015; 39:10-5.

Newman H, Maritz J. Basic overview of method validation in the clinical virology laboratory. Rev Med Virol. 2017; 27:e1940.

Olbrich-Neto J, Meira DA. Soroprevalence of HTLV-I/II, HIV, siphylis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu -São Paulo - Brazil. Risk factors for HTLV-I/II infection. Rev Soc Bras Med Trop.2004; 37(1):28-32.

Oliveira PD, Kachimarek AC, Bittencourt AL. Early Onset of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and adult T-cell leukemia/ lymphoma (ATL): Systematic search and review. J Trop Pediatr. 2018; 64(2):151-61.

Oliveira SR, Avelino MM. Soroprevalência do vírus linfotrópico – T humano tipo I entre gestantes em Goiânia, GO, Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2006; 28(8):467-72.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet. 1986; 1(8488):1031-2.

Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(3):265-74.

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 Americas. Rev Inst Med Trop Sao 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(7):1287-94.

Paiva AM, Assone T, Haziot MEJ, Smid J, Fonseca LAM, Luiz OC, et al. Risk factors associated with HTLV-1 vertical transmission in Brazil: longer breastfeeding, higher maternal proviral load and previous HTLV-1-infected offspring. Sci Rep. 2018; 8(1):7742.

Parry JV, Mahoney A, Mortimer PP. Are seroepidemiological surveys for human immunodeficiency virus infection based on tests on pools of serum specimens accurate and cost-effective?. Clin Diagn Virol. 1993; 1(3):167-78.

Paulino-Ramirez R, Tapia L, Ruiz-Matuk C, Charow R, Budhwani H, Routy JP. Human T-cell lymphotropic virus 1/2 and human immunodeficiency virus antibodies identification among transactional sex workers and drug users in the Dominican Republic. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2019; 113(6):293-7.

Pedroso C, Netto E, Weyll N, Brites C. Coinfection by HIV-1 and human lymphotropic virus type 1 in Brazilian children is strongly associated with a shorter survival time. J Acquir Immune Defic Syndr. 2011; 57(s3):S208-11.

Percher F, Jeannin P, Martin-Latil S, Gessain A, Afonso PV, Vidy-Roche A, et al. Mother-to-child transmission of HTLV-1 epidemiological aspects,

mechanisms and determinants of mother-to-child transmission. Viruses. 2016; 8(2):40.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77(12):7415-9.

Qiu X, Hodges S, Lukaszewska T, Hino S, Arai H, Yamaguchi J, et al. Evaluation of a new, fully automated immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies. J Med Virol. 2008; 80(3):484–493.

Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. J Clin Virol. 2007; 40(2):93-8.

Ribas JGR, Melo GCN. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35(4):377-84.

Romanelli LCF, Caramelli P, Martins ML, Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, et al. Incidence of human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in a long-term prospective cohort study of initially asymptomatic individuals in Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013; 29(9):1199-202.

Romanelli LCF, Caramelli P, Proietti ABFC. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): quando suspeitar da infecção?.Rev Assoc Med Bras. 2010; 56(3):340-7.

Rosadas C, Malik B, Taylor GP, Puccioni-Sohler. Estimation of HTLV-1 vertical transmission cases in Brazil per annum. PLoS Negl Tro Dis. 2018; 12(11):e0006913.

Rosadas C, Taylor GP. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet research needs. Front. Microbiol. 2019; 10:999.

Rosadas C, Tosswill JHC, Tedder R, Taylor GP. Pregnancy does not adversely impact diagnostic tests for HTLV-1/2 infection. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(9):e0007736.

Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. AIDS Rev. 2004; 6(3):144-54.

Rudmik L, Drummond M. Health Economic Evaluation: Important Principles and Methodology. Laryngoscope. 2013; 123:1341-7.

Ruiz-Mateos E, Ruiz-León MJ, Tarancón-Díez L, Gutiérrez 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. 2019; 264:40-4.

Secoli SR, Nita ME, Ono-Nita SK, Nobre M. Avaliação de tecnologia em saúde. II. A análise de custo-efetividade. Arq Gastroenterol. 2010; 47(4):329-33.

Sequeira CG, Tamegão-Lopes BP, Santos EJM, Ventura AMR, Moraes-Pinto MI, Succi RCM. Descriptive study of HTLV infection in a population of

pregnant women from the State of Pará, Northern Brazil.Rev Soc Bras Med Trop. 2012; 45(4):453-6.

Silva RX, Campos KR, Caterino-de-Araujo A. Pooling of sera for human T-cell lymphotropic virus (HTLV) screening in a time of increasing health care expenditure and limited resources. Rev Inst Med Trop S. Paulo., 2020;62:e27.

Soares CC, Georg I, Lampe E, Lewis L, Morgado MG, Nicol AF, et al. HIV-1, HBV, HCV, HTLV, HPV-16/18, and Treponema pallidum infections in a sample of Brazilian men who have sex with men. PLoS One. 2014; 9(8):e102676.

Sodré Barmpas DBS, Monteiro DLM, Taquette SR, Rodrigues NCP, Trajano AJP, Cunha JC, et al. Pregnancy outcomes and mother-to-child transmission rate in HTLV-1/2 infected women attending two public hospitals in the metropolitan area of Rio de Janeiro. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(6):e0007404.

Souza VG, Martins ML, Carneiro-Proietti, 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):159-62.

Styles CE, Seed CR, Hoad VC, Gaudieri S, Keller AJ. Reconsideration of blood donation testing strategy for human T-cell lymphotropic virus in Australia. Vox Sang. 2017; 112(8):723-32.

Tagaya Y, Matsuoka M, Gallo R. 40 years of the human T-cell leukemia virus: past, present, and future. F1000Res. 2019; 8(F1000 Faculty Rev):228.

Tamashiro H, Maskill W, Emmanuel J, Fauquex A, Sato P, Heymann D. Reducing the cost of HIV antibody testing. The Lancet.1993; 342(8863):87-90.

Tokunaga M, Uto H, Oda K, Tokunaga M, Mawatari S, Kumagai K, et al. Influence of human T-lymphotropicvirus type 1 coinfection on the development of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. J Gastroenterol. 2014; 49(12):1567-77.

Tosswill JHC, Taylor GP. Interpretation of low reactivity in the Abbot Architect rHTLV I/II assay. Transfus Med. 2018; 28(4):326-30.

Turpin J, Yurick D, Khoury G, Pham H, Locarnini S, Melamed A, et al. Impact of hepatitis B virus coinfection on human T-lymphotropic virus type 1 clonality in an indigenous population of Central Australia. J Infect Dis. 2019; 219(4):562-7.

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):100-6.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. Blood. 1977; 50(3):481-92.

Ureta-Vidal A, Angelin-Duclos C, Tortevoye P, Murphy E, Leperè JF, Buigues RP, et al. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type 1: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. Int. J. Cancer. 1999; 82(6):832-6.

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. J Infect Dis. 2004; 57(4):156-9.

Varandas CMN, Silva JLS, Primo JRL, Oliveira MFSP, Moreno-Carvalho O, Farre L, et al. Early Juvenile human T-cell lymphotropic virus type-1–associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: Study of 25 patients. Clin Infect Dis. 2018; 67(9):1427-33.

Vermeulen M, Van den Berg K, Sykes W, Reddy R, Ingram C, Poole C, et al. Health economic implications of testing blood donors in South Africa for HTLV 1 & 2 infection. Vox Sang. 2019; 114(5):467-77.

Willems L, Hasegawa H, Accolla 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; 137:41-8.

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):7994-9.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise crítica de custo/efetividade na utilização de pool de soros para a triagem de infecção por HTLV-1/2

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80902317.0.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis - DEVIT

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.548.064

Apresentação do Projeto:

O Brasil é um país endêmico para as infecções por HTLV-1 e HTLV-2, com cerca de 2 a 2,5 milhões de infectados. As prevalências variam dependendo da região geográfica e população de estudo. Desde 1993 a sorologia para HTLV-1/2 tornou-se obrigatória em Bancos de Sangue do Brasil e isto fez diminuir os casos de infecção por transfusão sanguínea. Atualmente, as vias sexual e vertical são as principais responsáveis pela manutenção destas infecções no país. A triagem de HTLV-1/2 não faz parte do rol de exames do pré-natal no SUS, tampouco é recomendada em outros serviços, sendo totalmente negligenciada apesar do grande número de infectados. Em gestantes as prevalências de HTLV-1/2 variam de 0,1% a 1,1%, sendo que 70% das mães amamentam seus filhos até os seis meses. Assim, introduzir a triagem HTLV-1/2 no pré-natal é de suma importância. Para reduzir custos dos exames para o SUS a triagem usando pool de soros sem perda de sensibilidade, pode ser uma alternativa.

Para analisar custo/efetividade do uso de pool de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2, serão utilizados amostras de soro/plasma provenientes de projetos de pesquisa pertencentes ao biorrepositório que se encontram estocadas na sala 1119 do Centro de Imunologia do IAL, em freezer -20 ºC, sob a guarda/responsabilidade de Dra. Adele Caterino de Araujo.

Serão utilizados o ensaio imunoenzimático de 3ª geração (Murex HTLV-I+II, Diasorin) e soros HTLV-1 e HTLV-2 reagentes com diferentes valores de densidades ópticas. Primeiramente os soros serão diluídos em soro não reagente de bolsa de sangue. Com base nos resultados obtidos

os mesmos soros serão diluídos em pool de soros de diferentes indivíduos (HTLV-1/2 soronegativos) e determinada a maior diluição que resulte reagente em amostras fracamente positivas no ELISA. Com isto será possível avaliar custo/efetividade do uso de pool de soros na triagem de HTLV-1/2. Com isso, pretende-se auxiliar a Secretaria de Estado da Saúde-SP e o Ministério da Saúde na recomendação da sorologia para HTLV no pré-natal evitando a perpetuação dessa infecção na população.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

- Avaliar o custo/efetividade do uso de pool de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2, com uso de ensaio imunoenzimático de 3ª geração e soros HTLV-1 e HTLV-2 reagentes com diferentes valores de densidades ópticas diluídos em soro não reagente de bolsa de sangue.

Objetivo Secundário

- Diminuir custo sem perda de sensibilidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

A pesquisadora afirma que não há riscos por ser estudo com amostras de biorrepositório.

É importante refletir sobre esta afirmativa, pois há o risco mínimo relacionado à confidencialidade e ao sigilo dos dados secundários referentes às amostras clínicas mesmo em repositório, nesse caso quesitos garantidos pela pesquisadora.

Benefícios

Os benefícios estão bem estabelecidos, frente ao que se espera alcançar com a referida pesquisa, que é a redução de custos da triagem de infecção por HTLV-1/2 para o Sistema Único de Saúde (SUS), e a possibilidade de sua implementação em acompanhamento de gestantes no pré-natal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de grande importância em saúde pública que busca uma alternativa viável para reduzir custos dos exames da triagem de infecção por HTLV-1/2 para o SUS a ser utilizado no futuro no pré-natal, usando pool de soros sem perda de sensibilidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória para este protocolo de pesquisa foram apresentados e

estão de acordo.

- Aprovação do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz e anuência da direção geral da instituição: CTC-IAL 65-J/2017 de 28/11/2017.
- Folha de rosto.
- A justificativa para dispensa do TCLE foi aceita pelo colegiado, pois está fundamentada na utilização de amostras de biorrepositórios de projetos anteriores, devidamente cadastrados e aprovados por este comitê para uso em pesquisas futuras.
- Termo de responsabilidade e sigilo da pesquisadora responsável.
- Declarações de sigilo e compromisso dos pesquisadores.
- Normas básicas para uso de material biológico em biorrepositório.

O documento contempla os procedimentos de guarda do material biológico humano (soros), o compromisso de sigilo e confidencialidade das informações pessoais associadas, explicita o local e endereço do repositório, o material de acondicionamento, as condições de armazenamento, o controle de acesso, a temporalidade, e a responsabilidade; ainda, o documento cita os protocolos de pesquisa anteriores e aprovados pelo CEPIAL que originaram o biorrepositório.

Recomendações:

Em próxima edição do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, revisar avaliação do risco. Em casos de utilização de amostras de biorrepositório os riscos são mínimos relacionados à confidencialidade e ao sigilo dos dados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa muito bem instruído, aprovado quanto a eticidade, e coerente com as normas institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL na reunião ordinária de 18 de janeiro de 2018.

O CEPIAL faz valer esta aprovação desde 18/01/2018 quando da deliberação da conclusão do parecer em reunião ordinária do colegiado.

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) 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 CEPIAL 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_1047613.pdf	07/12/2017 11:47:11		Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Pool.pdf	07/12/2017 11:45:27	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	APROVACAO_CTC_65J.pdf	05/12/2017 10:03:41	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_SIGILO_E_COMPROMISSO_RAFAEL.pdf	05/12/2017 10:02:27	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_SIGILO_E_COMPROMISSO_ELLEN.pdf	05/12/2017 10:02:13	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_SIGILO_E_COMPROMISSO_KAROL.pdf	05/12/2017 10:01:59	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_RESPONSABILIDADE_SIGILO_ADELE.pdf	05/12/2017 10:01:43	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMETIMENTO_ADELE.pdf	05/12/2017 10:00:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORREPOSITORIO_SOB_A_GUARDA_DE_ADELE_CATERINO_DE_ARAUJO.pdf	05/12/2017 09:59:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Orçamento	a_ctc_0008_000_planejamento_orcamentario.pdf	05/12/2017 09:58:33	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Cronograma	a_ctc_0007_001_cronograma_de_desenvolvimento.pdf	05/12/2017 09:58:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_POOL_DE_SOROS.pdf	05/12/2017 09:57:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 16 de Março de 2018

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