UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na metodologia da PCR em Tempo Real

Maurício Cristiano Rocha Junior

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na metodologia da PCR em Tempo Real

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Maurício Cristiano Rocha Junior

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha-Junior, M.C.

Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na metodologia de PCR em Tempo Real. Ribeirão Preto, 2014.

144 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Kashima, Simone.

1. HTLV-1/2. 2. Diagnóstico. 3. PCR em tempo real. 4. Confirmatório

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Maurício Cristiano Rocha Junior

Título do trabalho: Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na metodologia da PCR em Tempo Real.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho

A Deus, o grande arquiteto do Universo, fonte de amor e misericórdia;

Aos meus pais Maurício e Gislene, pela minha existência, cuidados, apoio e amor incondicional a mim confiados;

Ao meu Avô Euclides (*in memoriam*) como exemplo de honestidade e trabalho;

A minha Avó Lorides por ser uma segunda mãe;

A minha tia Giselda, apesar de longe, sempre presente em minha vida;

Ao meu tio Clóvis pela parceria de sempre;

Aos pacientes portadores do HTLV-1/2.

Agradecimentos

A Deus, pelo milagre da vida.

A todos os meus familiares, em especial minha mãe Gislene, a melhor mãe do mundo, que mesmo vendo seu filho partir de casa após 23 anos de convívio, sempre me apoiou, deu forças e permitiu que eu chegasse até aqui. Ao meu pai Maurício, mesmo que distante, me apoio em momentos de vitória e, principalmente, confiou em mim nos momentos de derrota. A minha avó Lourides, meu avô Euclides (in memoriam), minha tia Giselda e meu tio Clóvis pelo carinho apoio e compreensão em todos os momentos de ausência.

A minha orientadora Simone Kashima Haddad pela competência, seriedade e humildade. Agradeço pela paciência, atenção e confiança em meus primeiros passos no laboratório de Biologia Molecular. Frente alguns tropeços meus, sempre esteve pronta a estender a mão e ajudar a levantar. Agradeço ainda pela amizade, convívio diário e principalmente pela oportunidade dada. Minha eterna gratidão aos ensinamentos científicos e de vida.

A minha namorada, Juliana, pelo companheirismo, amor, paciência e carinho demonstrado e, por estar ao meu lado e compartilhar alegrias e vitórias e, acalmar meu coração nos momentos ruins e nas derrotas.

Aos pacientes portadores do HTLV-1/2, que em nome de Sandra do Valle e Laura Lee, meu muito obrigado, pois sem a colaboração deles este trabalho nunca teria saído do papel.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas pela confiança, e viabilização de todos os experimentos realizados na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de Doutorado concedida para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Jorge Casseb, Dra. Jerusa Smid, Dr. Augusto Penalva, Dr. Arthur, Maria Rita, Tati, Rosa e Camila do Instituto de Infectologia Emílio Ribas pela prontidão e por nos receber em seu Ambulatório.

Em nome do Dr. Bernardo Galvão, agradeço a todos da FIOCRUZ (Bahia) que colaboraram para o desenvolvimento desta trabalho.

A Elaine e Renata pelo competência e seriedade com que conduzem o núcleo de projetos e pesquisa da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

A Dalvinha e Carmen pela disponibilidade e carinho de sempre.

Ao pessoal da limpeza por proporcionar um ambiente de trabalho aconchegante.

Ao pessoal da Copa pela dedicação em sempre servir.

Ao pessoal do transporte pelas idas e vindas a São Paulo.

Ao equipe de enfermagem, sempre disposta em ajudar nas coletas de amostras.

Ao laboratório de Genética Molecular, em especial a Adriana e Anemari pelas ajudas incontáveis nas horas de aperto nos experimentos.

Ao Laboratório de Sorologia em especial a Vanderléia, Renata e Adriana.

Ao Laboratório NAT, em especial a Rochele que disponibilizou o Laboratório para a realização dos experimentos.

A vocês, membros da Banca examinadora, pela presença, correções e sugestões.

Ao Dr. Oswaldo Takaianagui e Dra. Ticiane responsáveis pelo Ambulatório de HTLV no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular pela ajuda em técnicas, discussões e companheirismo: Evandra, Aline Romagnoli, Aline Ferreira, Talita, Alexander, Fernandinha, Lucas, Mariana, Mayra, Suellen. Em especial, o Svetoslav, Kátia e Daiane pela dedicação e ajuda oferecida em diversas etapas deste trabalho.

Aos demais amigos do Hemocentro de Ribeirão Preto pelo companheirismo dentro e fora do ambiente de trabalho: Tathiane, Rodrigo Panepucci, Helder, Raquel, Gabi, Aline Bonfim e Lilian. Em especial, a Julinha e a Florencia pela ajuda aos 45 minutos do segundo tempo. A todos aqueles que porventura não citei, meu muito obrigado.

Aos funcionários da biblioteca Rodrigo e Marjorie pelo apoio e estrutura que me forneceram.

A Sandra pela competência e exímio trabalho desenvolvido nas artes visuais.

Ao todos os funcionários da Fundação Hemocentro que diretamente ou indiretamente colaboraram.

Aos amigos de Marília, em especial: Mateus, Alexandre, Ligia, Cesão, Bonis, Guguinha Michele (Gigéli) Cris, Gabriel (Gardena) Cassiano, Fernandinho, Tonhão, Benette, Pimel, Neto, Juninho. Enfim, a todos os Pardais que não mencionei aqui, meu muito obrigado.

Ao Joventino (Junior) pelos conselhos valiosos de vida e apoio.

Aos amigos que fiz em Ribeirão Preto, que são uma grande família e estiveram presentes em discussões, festa, choro e riso: Maria Fernanda (MF), Virginia (Japa),

Dalila, Marcela, Antônio Roberto (Ogro), Rodrigo Haddad (Turco), Daiani, Germano, Felipe (Gaúcho) e Emanuel (Bebô).

Aos meus amigos da república Casa de Família Luciano, Rodrigo, Eduardo e Banzé pelo agradável convívio no tempo em que morei com vocês.

Aos meus amigos de Faculdade Felipe Frasso, Felipe Mazzini, Kelton, Neto, Carlinha, Thaiane, Tathi, Carol, Bibiana e Karine pela amizade que se mantém viva até hoje.

Aos Professores da graduação, em especial Claudia, Lara, Flávia e Fabio pela amizade ensinamentos.

A os amigos que espiritualmente estiveram presente Renato e Nagib (in memoriam).

A Seção de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial o Henrique Teodoro pela disponibilidade, apoio e auxílio e, pela extrema dedicação e competência.

Desafio tão grande quanto escrever a tese foi a descrição dos agradecimentos, pois por muitas vezes cometemos injustiças e, pela memória falha, não mencionamos nomes de pessoas que também contribuíram para este trabalho. A não presença nestes agradecimentos, não diminui a importância que vocês tiveram e tem em meu trabalho e minha vida. Portanto, desculpas e MUITO OBRIGADO!!!

*"A experiência nunca falha, apenas
as nossas opiniões falham, ao esperar da
experiência aquilo que ela não é capaz de
oferecer". Leonardo da Vinci*

RESUMO

Rocha-Junior, M.C. **Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na metodologia da PCR em Tempo Real.** 2014. 144f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A significativa prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 no Brasil tornou compulsória a triagem sorológica em bancos de sangue desde 1993. A realização de um diagnóstico eficaz e seguro desta infecção tem importância no correto aconselhamento dos pacientes, bem como na adoção de medidas preventivas em relação à transmissão do HTLV-1/2. Entretanto, a ineficiência dos testes confirmatórios disponíveis somado ao alto custo, são fatores limitantes para a conclusão segura do *status* clínico do paciente. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, padronizar e validar uma plataforma molecular (NAT) *multiplex* utilizando a metodologia de PCR em tempo real para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2. Para tanto, foi padronizada a PCR em tempo real utilizando o sistema de sondas de hidrólise (TaqMan®) e a região gênica viral *pol* foi utilizada como alvo dessas reações. As reações foram otimizadas e validadas em amostras de DNA de controles positivos e negativos, amostras de DNA obtidas a partir do sangue total de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2, candidatos à doação de sangue e de pacientes infectados por outras viroses (HIV, HBV e HCV). Após a padronização, a plataforma molecular foi validada em relação aos seguintes parâmetros: sensibilidade analítica, sensibilidade diagnóstica, especificidade analítica, especificidade diagnóstica, precisão e robustez. O limite de detecção do teste (LoD) foi de 3,85 cópias/reação para HTLV-1 e 10,88 cópias/reação para HTLV-2. Para a especificidade, não foi observada reação cruzada com os vírus HAV, HBV, HCV, HIV-1 e HIV-2 e B19V obtidos a partir de um painel de referência viral e nem com amostras de indivíduos portadores de HIV, HBV ou HCV. A sensibilidade diagnóstica foi de 94,6% para HTLV-1 e 78,6% para HTLV-2. O coeficiente de variação encontrado no parâmetro precisão foi de até 0,475%. A metodologia desenvolvida é uma ferramenta simples, de baixo custo, sensível e altamente específica, portanto, adequada para detecção e discriminação da infecção por este retrovírus. A padronização desta plataforma tem um importante impacto no fortalecimento da capacitação tecnológica nacional. Além disso, propõe seu uso no algoritmo diagnóstico, o qual permitirá a conclusão segura do diagnóstico do HTLV-1/2.

Palavras chave: HTLV1/2; diagnóstico; PCR em tempo real; confirmatório.

ABSTRACT

Rocha-Junior, M.C. **Development of molecular platform for the confirmatory and discriminatory diagnosis of HTLV-1/2 infection based on Real-Time PCR methodology.** 2014. 144f PhD Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The significant prevalence of HTLV-1/2 infection in Brazil has turned the serological testing for this virus mandatory in national blood banks since 1993. The performance of efficient and safe diagnosis of this infection has importance on the correct counseling of the patients and the prevention of the transfusion/hemoderivatives transmitted HTLV-1/2 infection. However, the inefficiency of the available confirmatory tests combined with their high cost present limiting factors for adequate conclusions over the clinical status of the patient. A safe diagnosis of the HTLV-1/2 infection is of crucial importance for the correct counseling of the patients and prevention of the transmission of the infection by blood transfusions, breastfeeding and solid organ transplantations. Therefore, the objective of this study was to develop, optimize and validate a molecular multiplex platform (NAT) utilizing the real-time PCR methodology for confirmatory and discriminatory diagnosis of the HTLV-1/2 infection. DNA samples obtained from HTLV-1/2 positive patients, blood donor candidates, and HIV, HBV and HCV infected patients were used in this study. The real-time PCR was optimized using the TaqMan® system (hydrolysis probes) and the pol gene was a target for real-time amplification. After optimization, the molecular platform was validated by analysis of the analytic and diagnostic sensitivity, analytic and diagnostic specificity, precision, and robustness. The detection limit (LoD) of the test was 3.85 copies/reaction for HTLV-1 and 10.88 copies/reaction for HTLV-2. Evaluation of the specificity did not demonstrate cross reaction with human viruses like HAV, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2 and B19V obtained from a diagnostic panel and also with samples obtained from HIV, HBV or HCV positive individuals. The diagnostic sensitivity was 94.6% for HTLV-1 and 78.6% for HTLV-2. The estimated variation coefficient of the precision analysis was not more than 0.475%. Therefore, this methodology presents simple, inexpensive, sensitive and highly specific test, and can be used adequately for the detection and discrimination of this retroviral infection. The optimization of this molecular platform have important impact on the improvement of the technologic capability and it can be used for the definition of a national diagnostic algorithm which will permit a safe conclusion of the HTLV-1/2 diagnosis.

Key Words: HTLV-1/2, diagnostic, real-time PCR, confirmation

RESUMEN

Rocha-Junior, M.C. **Desarrollo de una Plataforma Molecular para el diagnóstico confirmatorio y discriminatorio de la infección por el HTLV-1/2 basado en la metodología de PCR en Tiempo Real.** 2014. 144f. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

La significativa prevalencia de la infección por el HTLV-1/2 en nuestro país tornó obligatorio el tamizaje serológico en bancos de sangre a partir de 1993. La realización de un diagnóstico eficaz y seguro de esta infección tiene importancia en el correcto asesoramiento de los pacientes, así como medida preventiva en la transmisión del HTLV-1/2 por medio de transfusiones sanguíneas y/o hemoderivados. Sin embargo, la ineficiencia de los tests confirmatorios disponibles acoplada al alto costo, son factores limitantes para la conclusión segura del *status* clínico del paciente. Un diagnóstico seguro de esta infección es de gran importancia para el correcto asesoramiento de los pacientes, así como para evitar la transmisión del HTLV-1/2 en transfusiones sanguíneas, lactancia materna o en transplante de órganos sólidos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar, padronizar y validar una plataforma molecular (NAT) *multiplex* utilizando la metodología de PCR en tiempo real para el diagnóstico confirmatorio y discriminatorio de la infección por el HTLV-1/2. RESULTADOS: Fueron utilizadas muestras de DNA obtenidas a partir de individuos infectados por HTLV-1/2, muestras de conditados a donación de sangre y muestras de pacientes infectados con HIV, HBV y HCV. La PCR en tiempo real fue padronizada utilizando el sistema TaqMan® (sondas de hidrólisis) y la región génica *pol* fue utilizada como blanco de esas reacciones. La plataforma molecular fue validada por medio de los siguientes parámetros sensibilidad analítica y diagnóstica, especificidad analítica y diagnóstica, precisión y robustez. El límite de detección del test (LoD) fue de 3,85 copias/reacción para HTLV-1 y 10, 88 copias/reacción para HTLV-2. Para la especificidad, no fue observada reacción cruzada con los virus HAV, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2 y B19V obtenidos de un panel viral de referencia, ni con muestras de individuos portadores de HIV, HBV o HCV. La sensibilidad diagnóstica fue de 94,6% para HTLV-1 y 78,6% para HTLV-2. El coeficiente de variación encontrado en el parámetro precisión fue de 0,475% como máximo. Por lo tanto, esta metodología es una herramienta simple, de bajo costo, sensible, y altamente específica, por lo tanto, adecuada para detección y discriminación de la infección por este retrovirus. La padronización de esta plataforma, tiene un importante impacto para el fortalecimiento de la capacitación tecnológica. Además de eso, propone un algoritmo diagnóstico nacional, lo cual permitirá la conclusión segura del diagnóstico del HTLV-1/2.

Palabras clave: HTLV1/2; diagnóstico/ PCR en tiempo real; confirmatorio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição do HTLV no mundo.....	27
Figura 2.	Prevalência do HTLV-1/2 no Brasil.....	29
Figura 3.	Representação da estrutura da partícula viral e organização genômica do HTLV-1.....	30
Figura 4.	Algoritmo diagnóstico para o HTLV preconizado nos bancos de sangue do Brasil.....	37
Figura 5.	Estágios do desenvolvimento, validação e manutenção de testes diagnósticos.....	40
Figura 6.	Fluxograma do delineamento experimental.....	46
Figura 7.	Análise do rendimento dos <i>kits</i> de extração de diferentes fabricantes (A, B e C) a partir do sangue (ST) total e do <i>buffy coat</i> .(BC).....	75
Figura 8.	Análise da pureza do DNA extraído com os <i>kits</i> de extração de diferentes fabricantes (A, B e C) a partir do sangue total (ST) e do <i>buffy coat</i> .(BC).....	76
Figura 9.	Alinhamento parcial do gene <i>pol</i> do HTLV-1 e HTLV-2.....	77
Figura 10.	Curvas de amplificação e curvas padrão no formato <i>singleplex</i>	80
Figura 11.	Curvas de amplificação nos formatos <i>singleplex</i> e <i>multiplex</i> (<i>biplex</i> e <i>triplex</i>).....	82
Figura 12.	Curvas de amplificação no formato <i>singleplex</i> para HTLV-2.....	84
Figura 13.	Comparação entre as curvas de amplificação no formato <i>singleplex</i> e <i>multiplex</i> para HTLV-2.....	85
Figura 14.	Esquema do segundo <i>primer</i> reverso para HTLV-2.....	86
Figura 15.	Comparação entre as curvas de amplificação no formato <i>singleplex</i> utilizando um ou dois <i>primers</i> reversos para HTLV-2.....	87
Figura 16.	Curvas de amplificação no formato <i>singleplex</i> utilizando diferentes concentrações de <i>primers</i> e sondas.....	88
Figura 17.	Curvas de amplificação utilizando as melhores condições obtidas nas reações de qPCR.....	89
Figura 18.	Curvas de amplificação no formato <i>multiplex</i> para a detecção simultânea dos três alvos utilizando diferentes concentrações de <i>primers</i> e sondas.....	90
Figura 19.	Curvas de amplificação utilizando <i>master mix</i> provenientes de diferentes fabricantes.....	91
Figura 20.	Curvas de amplificação utilizando <i>master mix</i> provenientes de diferentes fabricantes.....	92

Figura 21.	Curva de amplificação no formato <i>multiplex</i> com a presença de três alvos (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno).....	93
Figura 22.	Curvas de amplificação e curvas padrão no formato <i>multiplex</i> com a presença de três alvos (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno).....	94
Figura 23.	Esquema da montagem da placa de reação para o ensaio de robustez.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de <i>nested</i> PCR para HTLV-1/2.....	50
Tabela 2.	Isolados de HTLV-1, HTLV-2 utilizados no múltiplo alinhamento.	55
Tabela 3.	Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes da Clínica de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas–Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP submetidas aos testes confirmatórios de WB ou <i>nested</i> PCR.....	70
Tabela 4.	Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Instituto Emílio Ribas submetidas aos testes confirmatórios de WB ou <i>nested</i> PCR.....	71
Tabela 5.	Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Instituto Emílio Ribas sem co infecção.....	71
Tabela 6.	Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 e co-infectados com HBV, HCV e HIV provenientes do Instituto Emílio Ribas.....	72
Tabela 7.	Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz da Bahia.....	73
Tabela 8.	Perfil das amostras obtidas a partir das diferentes instituições.....	73
Tabela 9.	Média e o coeficiente de variação (CV) da concentração de DNA e pureza das amostras.....	74
Tabela 10.	Desenho de <i>primers</i> e sondas para a detecção do HTLV-1 e HTLV-2.....	78
Tabela 11.	Desenho de <i>primers</i> e sondas utilizados com alvo no gene da <i>beta-globina</i>	79
Tabela 12.	Comparação das reações de qPCR nos formatos <i>singleplex</i> e <i>triplex</i> (<i>multiplex</i>).....	83
Tabela 13.	Desenho do segundo <i>primer</i> reverso para HTLV-2.....	86
Tabela 14.	Avaliação da homogeneidade do <i>mix</i> (<i>primers</i> +sondas).....	95
Tabela 15.	Avaliação da homogeneidade dos controles positivos (lote 001).....	96
Tabela 16.	Avaliação da homogeneidade do controle negativo.....	97
Tabela 17.	Avaliação da estabilidade do <i>mix</i> (<i>primers</i> +sondas).....	98
Tabela 18.	Avaliação da estabilidade dos controles positivos (lote 001).....	99
Tabela 19.	Avaliação da estabilidade do <i>master mix</i>	101
Tabela 20.	Intra-ensaio para HTLV-1 e HTLV-2.....	102

Tabela 21.	Inter-ensaio para HTLV-1 e HTLV-2.....	102
Tabela 22.	Avaliação da Sensibilidade analítica para HTLV-1 e HTLV-2 (lote 01) utilizando o método de regressão linear Probit (IC 95%).....	104
Tabela 23	Avaliação da Sensibilidade analítica para HTLV-1 e HTLV-2 (lote 02) utilizando o método de regressão linear Probit (IC de 95%).....	105
Tabela 24	Amostras que apresentaram padrão indeterminado e não tipadas no método de WB avaliadas pela plataforma de PCR em tempo real desenvolvida.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = grau Celsius

μL = microlitros

3' = Região carboxi-terminal do ácido nucleico

5' = Região carboxi-terminal do ácido nucleico

ABI = *Applied Biosystems*

Ag/Ab = antígeno/anticorpo

AL = tampão de lise

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATLL = leucemia/Linfoma de Células T do Adulto

AW1 = tampão de lavagem 1

AW2 = tampão de lavagem 2

B19 = parvovírus B19

BBA = tampão de ligação

BC = *buffy coat*

BLAST = *Basic Local Alignment Search Tool*

bp = pares de base

bZIP = região básica e zipper de leucina

C = citosina

CA = capsídeo viral

CD = do inglês *cluster differentiation*

CD4⁺ = linfócito T *helper*

CD8⁺ = linfócito T citotóxico

CDs = células dendríticas

CI = controle interno de amplificação

CLD = tampão de lise de células

cm = centímetros

Ct = *cycle threshlod*

CV = coeficiente de variação

CWB = tampão de lavagem de coluna

DNA = ácido desoxirribonucleico

DP = desvio padrão

EDTA = anticoagulante etilenoaminotetracético

EIA = ensaio imunoenzimático

env = gene *env* do HTLV

EUA = Estados Unidos da América

g = força g

G = guanina

gag = gene *gag* do HTLV

GD21 = proteína recombinante do HTLV de 21 KDa

GLUT-1 = transportador de glicose tipo-1

gp21 = Glicoproteína transmembrana do HTLV-1 de 21 kDa

gp46 = Glicoproteína transmembrana do HTLV-1 de 46 kDa

Gu = linhagem de célula T humana infectada pelo HTLV-1

HAM/TSP = mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical

HBV = vírus da hepatite B

HC-FMRP/USP = Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HCV = vírus da hepatite C

HIV = vírus da imunodeficiência humana

HLA = antígeno leucocitário humano

HSPG = proteoglicanas de heparan sulfato

HTLV = vírus linfotrópico das células T humanas

HTLV-1 = vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 1

HTLV-2 = vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 2

HTLV-3 = vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 3

HTLV-4 = vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 4

IC = intervalo de confiança

IFA = imunofluorescência indireta

IN = integrase viral

IND = indeterminado

ISO = *International Organization for Standardization*

Kb = kilobases

LoD = limite de detecção

LTR = Repetições terminais *longas*

MA = Maranhão

MA = matriz viral

MGB = *minor groove binder*

mL = mililitro

mM = micromolar

MT-2 = linhagem de célula T humana infectada pelo HTLV-1

n° = número

NAT = tecnologia de ácidos nucleicos

NC = nucleocapsídeo viral

ng = nanogramas

NIBSC = *National Institute for Biological Standards and Control*

nm = nanômetro

NRP-1 = neurofilina-1

NTR = Ambulatório de Neurologia Tropical

OP = operador

OPTN = rede de captação e transplante de órgãos

P.A = para análise

p12 = Proteína do HTLV-1 de 12 kDa

p13 = Proteína do HTLV-1 de 13 kDa

p15 = Proteína do nucleocapsídeo do HTLV-1 de 15 kDa

p19 = Proteína da matriz do HTLV-1 de 19 kDa

p24 = Glicoproteína transmembrana do HTLV-1 de 24 kDa

p30 = Proteína do HTLV-1 de 30 kDa

PBMC = células mononucleares do sangue periférico

PBS = tampão fosfato tamponado com salina

PCR = reação em cadeia da polimerase

pmol = picomol

pol = gene *pol* do HTLV

PR = protease viral

pro = gene *pro* do HTLV

pX = região *pX* do HTLV

pxA = região *pxA* do HTLV

pxB = região *pxB* do HTLV

qPCR = PCR em tempo real

R= região R do HTLV

R^2 = correlação linear

rex = gene *rex* do HTLV

Rex = proteína Rex do HTLV

rgp46-I = glicoproteína recombinante do HTLV-1 de 46 KDa

rgp46-II = glicoproteína recombinante do HTLV-2 de 46 KDa

RIPA = radioimunoprecipitação

RNA = ácido ribonucleico

RNA_m = RNA mensageiro

RxRE = elementos responsivos a Rex

SC = Santa Catarina

SPSS = *Statistical Package for the Social Sciences*

ST = sangue total

SU = superfície viral

tax = gene *tax* do HTLV

Tax = proteína Tax do HTLV

T_m = temperatura d *melting*

TM = Transmembrana

TR = transcriptase reversa

TRE = elementos responsivo a Tax

U3' = região 3' única

U5 = região 5' única'

UETDI = Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas

UV = luz ultravioleta

WB = *Western Blot*

Sumário

I. INTRODUÇÃO.....	26
1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)	26
2. Origem e Epidemiologia do HTLV.....	26
3. Estrutura e organização genômica do HTLV	29
3.1 Estrutura da partícula viral.....	29
3.2 Organização genômica	31
4. Ciclo de multiplicação do HTLV	31
5. Vias de transmissão.....	33
6. Manifestações clínicas associadas ao HTLV	33
6.1 Leucemia/Linfoma de células T do Adulto	34
6.2 Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical.....	35
7. Diagnóstico laboratorial do HTLV	35
7.1 Testes moleculares	37
8. Métodos de validação aplicados ao diagnóstico	38
8.1 Precisão	38
8.2 Robustez.....	39
8.3 Sensibilidade e Especificidade Analítica	39
8.4 Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica	39
9. Justificativa	40
II. OBJETIVOS.....	44
1. Objetivo geral.....	44
2. Objetivos específicos	44
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
1. Casuística	47
1.1 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP)	47
1.2 Instituto de Infectologia Emílio Ribas	47
1.3 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz da Bahia	48
1.4 Hemocentro de Ribeirão Preto.....	48
1.5 Aspectos éticos	48

2. Sorologia para HIV, HCV, HBV e HTLV-1/2.....	49
3. <i>Western Blot</i> para HTLV-1/2	49
4. <i>Nested PCR</i> para HTLV-1/2	50
5. Padronização da extração de DNA a partir do sangue total e <i>buffy coat</i>	51
5.1 Fabricante A	51
5.2 Fabricante B.....	52
5.3 Fabricante C.....	53
6. Análise <i>in silico</i> para definição da região alvo – Desenho de <i>primers</i> e sondas	54
7. Controles Positivos: cultivo e expansão das linhagens celulares MT-2 e Gu	56
7.1 Extração de DNA a partir das linhagens celulares.....	57
7.2 Produção de lote dos controles positivos	58
8. Controle negativo	58
8.1 Produção de lote do controle negativo	58
9. Controle interno de amplificação (CI).....	59
9.1 Desenho de <i>primers</i> e sondas para o CI	59
10. Padronização das reações de qPCR no formato <i>singleplex</i>	59
10.1 Preparo da curva padrão a partir dos controles positivos.....	59
10.2 Padronização das reações de qPCR nos formatos <i>singleplex</i> e <i>multiplex</i> (<i>biplex</i> e <i>tríplex</i>).....	60
10.3 Padronização das concentrações de sondas e <i>primers</i> utilizadas nas reações de qPCR	60
10.4 Avaliação de insumos (<i>mix</i> para PCR em tempo real) provenientes de diferentes fabricantes.....	61
10.5 Padronização das concentrações de sondas e <i>primers</i> utilizadas nas reações de qPCR com o <i>master mix</i> do fabricante A.....	61
11. Produção de lote de <i>mix</i> (<i>primers</i> + sondas) para as reações de qPCR.....	62
12. Validação do lote dos reagentes e controles	63
12.1 Avaliação da homogeneidade do <i>mix</i> (sondas+ <i>primers</i>) e controles positivos e negativo.....	63
12.2 Avaliação da estabilidade do <i>mix</i> (sondas+ <i>primers</i>), controles positivos e <i>master mix</i>	63
13. Processo de validação aplicado a testes diagnósticos.....	64
13.1 Precisão	64
13.2 Robustez	64

13.3	Sensibilidade analítica.....	64
13.4	Especificidade analítica.....	65
13.5	Sensibilidade diagnóstica.....	65
13.6	Especificidade diagnóstica.....	66
14.	Definição do <i>Threshold</i> para as reações de qPCR	67
15.	Definição do <i>cut off</i> para as reações de qPCR	67
16.	Análises estatísticas	67
IV.	RESULTADOS.....	69
1.	Avaliação do perfil sorológico das amostras do grupo controle e dos indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 das diferentes instituições.....	69
1.1	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP).....	69
1.2	Instituto de Infectologia Emílio Ribas	70
1.3	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (Bahia).....	72
1.4	Hemocentro de Ribeirão Preto	73
2.	Padronização da extração de DNA: Avaliação de três <i>kits</i>	74
3.	Análise <i>in silico</i> para definição da região gênica alvo - Desenho de <i>primers</i> e sondas	76
3.1	Alinhamento múltiplo dos genomas do HTLV-1 e 2	76
3.2	Desenho de sondas e <i>primers</i> no sistema TaqMan® para HTLV-1/2	78
4.	Desenho de <i>primers</i> e sonda para o gene da <i>beta-globina</i>	78
5.	Padronização das reações de PCR em tempo real (qPCR) no formato <i>singleplex</i>	79
6.	Padronização das reações de PCR em tempo real (qPCR) no formato <i>multiplex</i>	80
7.	Padronização da concentração dos <i>primers</i> e sondas utilizados nas reações de qPCR	83
7.1	Desenho de um <i>primer</i> reverso extra (reverso') para HTLV-2.....	85
7.2	Determinação das concentrações ideais para as reações de qPCR no formato <i>singleplex</i>	87
7.3	Teste com as melhores concentrações de sondas e <i>primers</i> no formato <i>multiplex</i>	88
7.4	Avaliação de insumos provenientes de diferentes fabricantes	90
8.	Ajuste fino das concentrações das sondas e <i>primers</i> no formato <i>multiplex</i>	92
9.	Validação do lote dos reagentes e controles.....	94
9.1	Avaliação da homogeneidade do <i>mix</i> (sondas + <i>primers</i>)	94

9.2	Avaliação da homogeneidade dos controles positivos e negativos.....	95
9.3	Avaliação da estabilidade do <i>mix</i> (sondas+ <i>primers</i>).....	97
9.4	Avaliação da estabilidade dos controles positivos	98
9.5	Avaliação da estabilidade do <i>master mix</i>	100
10.	Processo de Validação aplicado a testes diagnósticos.....	101
10.1	Precisão	101
10.2	Robustez.....	103
10.3	Sensibilidade analítica	103
10.4	Especificidade analítica	105
10.5	Sensibilidade diagnóstica	106
10.6	Especificidade diagnóstica	106
11.	Resolução de casos sem definição de tipo viral e indeterminados no teste de <i>Western Blot</i> (WB)	106
V.	DISCUSSÃO	109
1.	Padronização da extração de DNA.....	109
2.	Região gênica para desenho de <i>primers</i> e sondas e metodologias de detecção.....	110
3.	Validação.....	112
4.	Resolução do <i>status</i> da infecção.....	118
5.	Aplicabilidade	119
	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
	ANEXOS	135

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

O primeiro indício de que as infecções virais poderiam ser a causa de neoplasias em humanos foi documentado por Rous (1911). Em 1979, o isolamento do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), a partir de células cancerígenas de um paciente com linfoma cutâneo de células T (Poiesz *et al.*, 1980), confirmou a hipótese da existência de um retrovírus como agente etiológico do desenvolvimento do câncer. O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano descrito, estabelecendo definitivamente o envolvimento dos retrovírus nas infecções humanas. Pouco tempo após sua identificação, um segundo retrovírus humano foi descrito, o HTLV-2, que por sua vez, foi isolado a partir de uma linhagem de células T obtidas de um paciente com leucemia de células pilosas (Kalyanaraman *et al.*, 1982).

O HTLV-1 está associado a duas principais manifestações clínicas: i) uma doença hematológica aguda envolvendo células T denominada leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982); ii) uma doença de caráter neuroinflamatório degenerativa e progressiva denominada mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP). O risco para o desenvolvimento tanto da ATLL quanto HAM/TSP é cerca de 3 a 5%, o que torna assintomática a maioria dos indivíduos portadores deste retrovírus. A infecção pelo HTLV-2 tem sido associada a casos esporádicos de doenças neurológicas que se assemelham a HAM/TSP. Em 2005, dois novos tipos de HTLV foram identificados em caçadores camaroneses de primatas: HTLV-3 e HTLV-4 (Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005). No entanto, as informações sobre estes novos tipos virais não são suficientes para determinar se estes retrovírus são transmissíveis, ou ainda, se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (Mahieux e Gessain, 2009).

2. Origem e Epidemiologia do HTLV

A origem do HTLV ainda é controversa. Sugere-se que a infecção em humanos originou-se na África, por transmissão enzoótica, a partir de primatas não humanos. Aparentemente, o HTLV foi introduzido no continente americano a partir de migrações vindas da Ásia há cerca de 12.000 anos e pelos negros africanos durante o período de

tráfico de escravos no século XVI (Gallo *et al.*, 1983; Gessain *et al.*, 1992; Saksena *et al.*, 1992; Gabbai *et al.*, 1993; Song *et al.*, 1995; Gotuzzo *et al.*, 2000). No Japão, estudos sugerem que o vírus foi introduzido por meio de sucessivas migrações humanas em épocas remotas (2.300 a 10.000 anos atrás) (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002). Enquanto a infecção pelo HTLV-1 é distribuída mundialmente, a infecção pelo vírus do tipo 2 parece estar alocada predominantemente no hemisfério ocidental (Proietti, 1992).

Na década de 1990, De Thé e colaboradores estimaram que existissem cerca de 10 a 20 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV no mundo. No entanto, um estudo recente, baseado em uma população de 1,5 bilhões de indivíduos de áreas endêmicas, estima que este número seja entre cinco e dez milhões (Gessain e Cassar, 2012). Países populosos como a China e Índia não foram analisados, e assim, o número de portadores da infecção pelo HTLV possivelmente é maior. As principais áreas endêmicas no mundo para a infecção pelo HTLV-1 incluem o sudoeste do Japão, Caribe, África Sub Saariana, Américas Central e do Sul, Irã e Melanésia (Proietti *et al.*, 2005). Na Europa, apenas a Romênia é considerada uma região endêmica. Esta característica torna o HTLV-1 um vírus com distribuição geográfica definida, apresentando áreas com alta endemicidade circundadas por bolsões nos quais a infecção por este retrovírus é ausente (Gessain e Cassar, 2012) (Figura 1).

Figura 2. Distribuição do HTLV no mundo. O tamanho da circunferência é proporcional ao número de indivíduos infectados pelo HTLV-1. As prevalências indicadas variam de 1.000 até 1.000.000 de indivíduos infectados (Adaptado de Gessain *et al.*, 2012).

Contudo, a maioria dos dados sobre as taxas de prevalência do HTLV se baseiam em estudos de grupos específicos pouco representativos da população geral, como doadores de sangue gestantes, pacientes portadores de doenças hematológicas/neurológicas, populações nativas ou grupos isolados, usuários de drogas intravenosas e profissionais do sexo. Além disso, a prevalência sofre variação de acordo com o sexo, idade e nível sócio econômico na maioria das áreas endêmicas para HTLV (Kajiyama *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1991; Mueller *et al.*, 1996). Assim, a prevalência da população geral ainda é desconhecida e possivelmente superior do que constatado nesses estudos.

O Brasil detém cerca de 2,5 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV, o que o torna o país com maior número absoluto de indivíduos acometidos por esta retrovírose. A infecção pelo HTLV-1 apresenta uma grande heterogeneidade geográfica nas taxas de prevalência entre doadores de sangue, variando de 0,4/1.000 em Florianópolis-SC, até 10/1.000 em São Luís-MA. Em geral, as taxas de prevalência nas capitais do Sul do país são menores, e maiores nas regiões Norte e Nordeste (Catalan-Soares *et al.*, 2005) (Figura 2).

Figura 2. Prevalência do HTLV-1/2 no Brasil. A prevalência de HTLV-1/2 foi baseada nos doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (Adaptado de (Catalan-Soares *et al.*, 2005)).

Na região de Ribeirão Preto, a soroprevalência entre doadores de sangue é 0,1% (Pinto *et al.*, 2012). Sabe-se que o grupo de doadores de sangue não reflete diretamente a prevalência na população geral, ficando esta subestimada. Por sua vez, o HTLV-2 é endêmico entre usuários de drogas injetáveis nos EUA, Europa e Sudoeste da Ásia, e particularmente entre os Ameríndios das Américas do Norte, Central e do Sul. A taxa de infecção por esse retrovírus é geralmente baixa, mas entre grupos de alto risco e tribos indígenas do Brasil, a soroprevalência varia de 1% a mais de 40% (Ishak *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1996; Ishak *et al.*, 1998).

3. Estrutura e organização genômica do HTLV

3.1 Estrutura da partícula viral

O HTLV-1 é um vírus do tipo C, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus* (Coffin, 1992; 1992b). É um vírus com

aproximadamente 100-140 nm de diâmetro de morfologia esférica, cuja estrutura (envelope, nucleocapsídeo e nucleóide) é similar a de outros retrovírus.

A partícula viral madura é circundada por um envelope, originado a partir da membrana da célula hospedeira. Esse envelope é composto por uma dupla camada proteolipídica, a qual contém uma proteína transmembrana (TM - gp21) ancorada em uma glicoproteína de superfície (SU - gp46). Junto à camada interna do envelope encontra-se a matriz viral (MA - p19), que, por sua vez, organiza os componentes virais em seu interior. O capsídeo icosaédrico (CA - p24) é composto principalmente pelas proteínas codificadas pelo gene *gag*. Esta estrutura encerra e protege o genoma viral. Outras proteínas também estão presentes no interior do CA, como as integrases (IN), proteases (PR) e transcriptase reversa (TR) que juntamente com o nucleocapsídeo (NC - p15) estão organizados em um complexo ribonucleoproteico (Ohtsuki *et al.*, 1982) (Figura 3).

Figura 3. Representação da estrutura da partícula viral e organização genômica do HTLV-1. À esquerda, está representada a partícula viral do HTLV-1. As linhas indicam as principais proteínas virais. (Adaptado de Lairmore *et al.*, 2012 e Matsuoka *et al.*, 2007). À direita, está representado o genoma do HTLV-1 indicando os genes e principais moléculas de RNA produzidas durante a transcrição.

3.2 Organização genômica

O genoma do HTLV é composto por duas fitas simples de RNA idênticas de polaridade positiva. Com organização semelhante aos demais retrovírus, o genoma proviral é composto pelos genes enzimáticos e estruturais *gag*, *pro*, *pol* e *env*. Possui também uma região pX, localizada entre o gene *env* e a extremidade 3'LTR, a qual é responsável por codificar uma série de genes acessórios que incluem *tax*, *rex*, *p12*, *p30*, *p13*, e *HTLV-1bZIP fator* (Seiki *et al.*, 1983; Gaudray *et al.*, 2002; Matsuoka e Jeang, 2007) (Figura 3).

O DNA proviral do HTLV -1 e HTLV-2 possui 9.032 pb e 8.952 pb, respectivamente (Seiki *et al.*, 1983; Shimotohno *et al.*, 1985). Ambas as extremidades são flanqueadas por uma região repetida, denominada *long terminal repeats* (LTR) responsável pela integração do DNA proviral no cromossomo do hospedeiro e regulação transcricional do genoma do HTLV (Berneman *et al.*, 1992). Cada LTR é composta pelas regiões U3' (3' única), R (repetida) e U5 (5' única). A região U3 do HTLV contém múltiplos sítios de ligação de fatores de transcrição como os elementos responsivos à Tax (TRE), o que a torna fundamental na regulação da transcrição gênica viral. A região R, por sua vez, é composta por diversos elementos responsivos à Rex (RxRE) que são essenciais para a exportação nuclear dos transcritos virais. O HTLV maximiza a utilização do seu genoma por meio de mudanças de fases de leitura para produzir proteínas precursoras, estruturais e enzimáticas, bem como, *splicing* alternativo para gerar múltiplas proteínas virais a partir da mesma região codificante (Journé *et al.*, 2009).

4. Ciclo de multiplicação do HTLV

O HTLV tem a capacidade de infectar diversos tipos celulares *in vitro*, incluindo linfócitos B e T, células dendríticas (CDs), macrófagos, células endoteliais, astrócitos e células estromais mesenquimais. Entretanto, em indivíduos infectados o vírus é encontrado predominantemente em células T CD4⁺ (Nagai *et al.*, 2001; Manel *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2014). O processo de replicação do HTLV pode ser dividido em duas fases. Na primeira, as partículas virais aderem à superfície das células não infectadas por meio da interação das glicoproteínas virais de superfície gp 46 com os receptores celulares transportadores de glicose (GLUT-1), proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG), ou neurofilina-1 (NRP-1). Essas interações permitem a fusão

entre o envelope viral e a membrana da célula alvo. Após a penetração do capsídeo na célula hospedeira, o vírus sofre desnudamento, e em seguida, o *core* viral é liberado no citoplasma. No *core* viral, o RNA é transcrito reversamente, pela ação da TR, em um DNA dupla fita, o qual é transportado até o núcleo e integrado ao genoma hospedeiro por meio da ação enzimática da integrase viral. Na segunda fase, a transcrição do genoma proviral é iniciada pela RNA polimerase II do hospedeiro, resultando na geração de RNAm virais, que após processamento e *splicing*, são transportados para o citoplasma onde são traduzidos nas proteínas virais. Finalmente, novas partículas virais são montadas e liberadas por brotamento da membrana celular da célula hospedeira (Yasunaga e Matsuoka, 2011; Hoshino, 2012).

Apesar de estudos apontarem opiniões divergentes quanto à infectividade do HTLV, a maioria deles demonstra que o HTLV é transmitido principalmente por meio da interação célula-célula (Hoshino, 2012; Pique e Jones, 2012). Assim, quatro mecanismos de transmissão viral são sugeridos: **i) sinapse viral:** as células T infectadas pelo HTLV formam espontaneamente conjugados com células T não infectadas. As proteínas virais Gag e Env e os RNA genômicos são reorientados para o ponto de contato entre as células T, indicando que a montagem viral ocorre na junção entre a célula infectada e não infectada. Este contato estável entre as células determina um espaço intracelular denominado fenda sináptica favorecendo a transferência do HTLV de maneira polarizada da célula infectada para a célula não infectada (Igakura *et al.*, 2003); **ii) biofilme viral:** após o brotamento viral, as células infectadas pelo HTLV mantêm as partículas virais associadas à matriz extracelular composta por colágeno, agrino e ligantes de proteínas de superfície, constituindo o biofilme viral. Quando as células infectadas pelo HTLV são expostas a células não infectadas, o biofilme viral é rapidamente transferido para a superfície da célula alvo, resultando em infecção (Pais-Correia *et al.*, 2010); **iii) conduítes celulares:** as células infectadas pelo HTLV podem transferir partículas virais por meio da formação de projeções transitórias da membrana plasmática (conduítes) em direção à célula não infectada (Van Prooyen *et al.*, 2010); **iv) transmissão por células apresentadoras de antígenos:** além da transmissão entre as células T, o HTLV pode ser transferido das CDs para as células T por meio de *infecção cis* ou *trans*. Na infecção *cis*, as CDs são infectadas, produzem novas partículas virais e as transferem para as células T não infectadas. Por outro lado, na infecção *trans*, as CDs não

infectadas capturam partículas virais produzidas pelas células T e infectam novas células T (Jones *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2009).

Como a taxa de replicação do HTLV em células infectadas é normalmente baixa, este retrovírus pode combinar múltiplas estratégias a fim estabelecer uma eficiente transmissão viral entre as células.

5. Vias de transmissão

As principais vias de transmissão do HTLV são a vertical, por meio do aleitamento materno, a parenteral por transfusão de hemocomponentes celulares infectados ou compartilhamento de seringas por usuários de drogas intravenosas e a sexual (Tajima *et al.*, 1982; Kinoshita *et al.*, 1984; Jason *et al.*, 1985). A eficiência da transmissão materno-infantil é estimada em 20% e está relacionada a variáveis individuais como carga proviral, HLA de classe I e duração da amamentação (Hino *et al.*, 1995; Nyambi *et al.*, 1996; Ureta-Vidal *et al.*, 1999; Goncalves *et al.*, 2010). A taxa de transmissão intrauterina ou durante o parto mostra-se inferior a 5% (Goncalves *et al.*, 2010). A transmissão do HTLV pode ocorrer também pelo transplante de órgãos sólidos, a partir de doadores infectados (Zarranz *et al.*, 2001; Zarranz Imirizaldu *et al.*, 2003; Nowicki *et al.*, 2006)

O desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV está diretamente relacionado à via de infecção. A ATLL está relacionada principalmente à transmissão por aleitamento materno, enquanto à HAM/TSP está associada à transfusão sanguínea (Uchiyama *et al.*, 1977; Osame *et al.*, 1990; Fujino e Nagata, 2000).

6. Manifestações clínicas associadas ao HTLV

O HTLV-1 é considerado o agente etiológico das principais patologias: mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL). Outras condições clínicas menos frequentes de caráter inflamatório também estão associadas à infecção pelo HTLV-1, como artropatias, polimiosites, uveítes, dermatite infectiva e Síndrome de Sjögren (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986; Morgan *et al.*, 1989; Nishioka *et al.*, 1989; Mochizuki *et al.*, 1992; Mariette *et al.*, 1995; La Grenade *et al.*, 1996). Adicionalmente, uma elevada taxa de co-infecções oportunistas como a tuberculose e a *estrongiloidíase* foi observada, devido à imunossupressão subclínica decorrente da infecção causada por este retrovírus

(Goncalves *et al.*, 2010). A relação do HTLV-2 com doenças neurológicas e sistêmicas é menos definida, no entanto, alguns estudos sugerem que o HTLV-2 esteja associado a casos esporádicos que se assemelham a HAM/TSP (Mahieux e Gessain, 2003; Feuer e Green, 2005).

Uma pequena proporção de indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolve a HAM/TSP ou a ATLL. Cerca de 95-98% dos portadores desta infecção permanecem assintomáticos por toda a vida. Alguns estudos demonstram que o risco estimado para desenvolvimento de HAM/TSP é 0,3-4%, enquanto para o desenvolvimento da ATLL, é 5% (Kaplan *et al.*, 1990; Shimoyama, 1991). Contudo, em 2013, Okajima e colaboradores relataram que 76% dos indivíduos classificados como assintomáticos apresentavam algum grau de acometimento de pele. A distinção entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos baseado somente nas doenças de caráter neurológico e hematológico não refletem a verdadeiro *status* do indivíduo, portanto, uma nova classificação clínica poderia ser sugerida.

6.1 Leucemia/Linfoma de células T do Adulto

A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) é uma entidade clínico-patológica distinta de outras neoplasias hematológicas, devido a sua associação etiológica com o HTLV-1 (Yoshida *et al.*, 1984). A ATLL é uma doença linfoproliferativa agressiva caracterizada pela infiltração de células T CD4⁺ malignas nos linfonodos, baço, trato gastro-intestinal e pele, além da presença de células T anormais com núcleo lobulado ou forma de flor (*flower cells*), geralmente fatal e não responsiva à quimioterapia (Uchiyama *et al.*, 1977; Shimoyama, 1991; Matsuoka, 2005; Bittencourt *et al.*, 2007). A diversidade das manifestações clínicas determina a subdivisão da doença em quatro subtipos: aguda, crônica, linfomatosa e indolente (*smoldering*) (Shimoyama, 1991). Além desses tipos clínicos, existe ainda outra categoria, conhecida como forma tumoral primária de pele, cujas manifestações são restritas à pele e apresentam um curso altamente agressivo (Bittencourt *et al.*, 2007). Dados apontam que cerca de um terço a um quarto dos linfomas de células T maduras estão associados à infecção pelo HTLV-1. Devido à semelhança dos sintomas com outras doenças linfoproliferativas, como leucemia linfóide crônica, síndrome de Sézary e outros linfomas, a ATLL permanece

subdiagnosticada em vários países no mundo, inclusive no Brasil (Shimoyama, 1991; Pombo De Oliveira *et al.*, 1995; Barbosa, 1997).

6.2 Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical

Na prática clínica, a HAM/TSP caracteriza-se como uma mielopatia crônica, de caráter inflamatório, sem remissão e com progressão variável entre os diferentes pacientes (Roman *et al.*, 1987; Vernant *et al.*, 1987; Kuroda *et al.*, 1991; Araujo *et al.*, 1995; Gotuzzo *et al.*, 2004). Esta entidade clínica manifesta-se como mielite crônica envolvendo as substâncias branca e cinzenta da medula espinhal, acompanhada de desmielinização perivascular e degeneração axonal (Cooper *et al.*, 2009). Os indivíduos acometidos pela HAM/TSP desenvolvem paraparesia espástica de instalação insidiosa e progressiva apresentando graves distúrbios de marcha (Roman e Osame, 1988). Outros sinais relacionados à doença são anormalidades sensoriais periféricas, dor lombar persistente, hiper-reflexia dos membros inferiores, disfunção da bexiga e do intestino e impotência sexual (Nagai e Osame, 2003; Oliveira *et al.*, 2007; Goncalves *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da HAM/TSP é mais frequente em mulheres e o início dos sintomas ocorre geralmente por volta da quarta e quinta década de vida (Orland *et al.*, 2003). Apesar desta manifestação crônica ser considerada um evento raro e muitas vezes tardio, pode também acometer crianças e em alguns casos, pode ser uma doença de rápida progressão (Kramer *et al.*, 1995). A alta carga proviral do HTLV-1 está associada ao desenvolvimento da HAM/TSP, entretanto, não é suficiente para o prognóstico da doença, o que indica a participação de outros fatores como a resposta imunológica individual, e características genéticas do hospedeiro neste processo (Nagai *et al.*, 1998; Catalan-Soares *et al.*, 2009; Talledo *et al.*, 2010; Rocha-Junior *et al.*, 2012). Embora as patologias associadas ao HTLV-1 mais estudadas sejam as neurológicas e hematológicas, à medida que os estudos se desenvolvem, mais se evidencia que a doença pode ser sistêmica, evoluindo provavelmente para o conceito de síndrome (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

7. Diagnóstico laboratorial do HTLV

O potencial da disseminação do HTLV-1/2 por meio da transfusão sanguínea incitou a triagem sorológica em bancos de sangue, inicialmente no Japão em 1986, seguida dos

Estados Unidos em 1988, sendo gradativamente implantada em outros países. (Vrieling *et al.*, 1997). No Brasil, a triagem sorológica em doadores de sangue tornou-se compulsória a partir de 1993, de acordo com a Portaria nº 1.376 (19/11/1993) do Ministério da Saúde.

O diagnóstico da infecção pelo HTLV é realizado em duas etapas: triagem e confirmação. Na triagem, são utilizados testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos dirigidos contra o vírus, tais como testes imunoenzimáticos (EIA), quimioluminescência e aglutinação de micropartículas de látex sensibilizadas (Verdier, Denis, *et al.*, 1990; Thorstensson *et al.*, 2002). Os antígenos frequentemente utilizados nos testes disponíveis no mercado são aqueles encontrados no lisado viral do HTLV-1 e HTLV-2 acrescidos das proteínas recombinantes derivadas do envelope viral, as quais aumentam a sensibilidade do teste. Para a confirmação, podem ser utilizados o *Western Blot* (WB), a reação em cadeia da polimerase (PCR), a radioimunoprecipitação (RIPA) e a imunofluorescência indireta (IFA) (Verdier, Leonard, *et al.*, 1990; Thorstensson *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2011). Rotineiramente, o WB é utilizado como método confirmatório, permite discriminar a infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 devido à adição de antígenos recombinantes de cada tipo viral. Entretanto, o teste de WB apresenta frequentemente resultados inconclusivos devido a reatividades inespecíficas (Kwok *et al.*, 1990; Lal, 1996; Thorstensson *et al.*, 2002; Abrams *et al.*, 2011). O teste ainda apresenta elevado custo, o que o torna inviável para implementação do mesmo na rotina diagnóstica (Carneiro-Proietti *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2010). Diferentes algoritmos confirmatórios têm sido propostos para a confirmação de testes positivos obtidos na triagem sorológica o que demonstra a complexidade da definição na infecção pelo HTLV-1/2 (Carneiro-Proietti *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2011).

A partir da sistematização da triagem sorológica em bancos de sangue, os problemas relacionados à conclusão do diagnóstico, como o elevado número de resultados indeterminados, começaram a surgir. O algoritmo nacional para a triagem sorológica em doadores de sangue preconiza a utilização de um método altamente sensível como o EIA. Entretanto, a confirmação dos resultados positivos da triagem sorológica por outro método, como o WB, não é obrigatório (Figura 4) principalmente devido ao alto custo associado à ineficiência do teste. Diante dessas dificuldades, os testes moleculares se impuseram para a conclusão segura do diagnóstico da infecção pelo HTLV.

Figura 4. Algoritmo diagnóstico para o HTLV preconizado nos bancos de sangue do Brasil. (Adaptado de Manual técnico para a investigação da transmissão de doenças pelo sangue, ANVISA, 2004).

7.1 Testes moleculares

O diagnóstico molecular da infecção pelo HTLV é realizado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual se baseia na pesquisa de sequências genômicas provirais do HTLV no espécime clínico. Esta técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade devido à amplificação de fragmentos de DNA pré-determinados. Desta forma, a PCR possibilita a identificação de cepas divergentes que não estão incluídas nos testes sorológicos, bem como a identificação da infecção em pacientes que se encontram no período de janela imunológica (Madeleine *et al.*, 1993; Ishak *et al.*, 1998).

O DNA proviral do HTLV-1/2 pode ser detectado e/ou quantificado por meio da amplificação de diferentes regiões do genoma viral. As regiões *gag*, *pol*, *env*, *tax* e *rex* são comumente utilizadas neste procedimento (Gabbai *et al.*, 1993; Poiesz *et al.*, 2000;

Thorstensson *et al.*, 2002; Vitone *et al.*, 2006). Com o objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade, a *nested* PCR pode ser realizada, na qual uma segunda reação de amplificação é realizada com o produto da primeira reação. Em 1992, Higuchi e colaboradores, introduziram a ideia da PCR em tempo real (qPCR). Esta técnica é capaz de detectar e quantificar em tempo real os produtos da PCR durante a reação de amplificação, medindo o aumento da intensidade de fluorescência durante a reação. Esta tecnologia detecta os produtos específicos de uma reação de PCR por meio da clivagem de uma sonda duplamente marcada com fluoróforo, a qual se hibridiza na região do DNA entre os sítios de ligação dos *primers*. Pela característica de apresentar alta sensibilidade e especificidade, a qPCR é um método capaz de esclarecer estados sorológicos indeterminados, bem como discriminar a infecção causada pelo HTLV-1 e HTLV-2.

Diversos autores descrevem diferentes protocolos de qPCR para o diagnóstico do HTLV-1/2. Contudo, estes protocolos utilizam diferentes equipamentos e métodos de detecção, bem como regiões gênicas virais distintas. Além disso, as metodologias propostas apresentam deficiências na padronização e no processo de validação, impactando diretamente na sensibilidade e especificidade do teste (Dehee *et al.*, 2002; Estes e Sevall, 2003; Adaui *et al.*, 2006; Besson e Kazanji, 2009; Moens *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2011).

8. Métodos de validação aplicados ao diagnóstico

O processo de validação determina o desempenho de um teste diagnóstico, o qual deve ser adequadamente desenvolvido e otimizado. Os critérios avaliados na validação devem contemplar os parâmetros analíticos, os quais incluem precisão, sensibilidade e especificidade e parâmetros diagnósticos, incluindo a sensibilidade e especificidade.

8.1 Precisão

A precisão de um ensaio é definida como o grau de variação entre resultados obtidos sob condições experimentais estipuladas. Este parâmetro é avaliado por meio da repetibilidade e reprodutibilidade. A repetibilidade refere-se à máxima concordância entre testes sucessivos da mesma amostra submetidos às mesmas condições. Já a reprodutibilidade refere-se à máxima concordância entre testes sucessivos de um mesmo analito sob diferentes condições operacionais.

8.2 Robustez

A robustez de um teste é um método utilizado para aferir o potencial de contaminação de uma reação devido ao arraste (*carry over*) de DNA de uma amostra positiva para uma amostra negativa.

8.3 Sensibilidade e Especificidade Analítica

A sensibilidade analítica ou limite de detecção é definido como a quantidade mínima de uma substância ou organismo que o teste é capaz de detectar. A especificidade analítica ou avaliação de reatividade cruzada é dada pela capacidade do teste em identificar exclusivamente a substância alvo ou organismo em uma reação.

8.4 Sensibilidade e Especificidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica é uma característica inerente ao teste e refere-se a capacidade do teste em reconhecer os verdadeiros positivos em relação ao total de doentes. Por outro lado, a especificidade diagnóstica caracteriza-se pela capacidade de um teste em não detectar como positivo os indivíduos sadios, ou seja, excluir o estado de doença quando a mesma é ausente.

O processo de validação de um teste engloba o desenvolvimento e a documentação do desempenho do teste diagnóstico, bem como a avaliação constante de controles que asseguram a sua qualidade. A figura 5 demonstra os passos para a validação de um teste diagnóstico, desde sua concepção até implementação e manutenção.

Figura 5. Estágios do desenvolvimento, validação e manutenção de testes diagnósticos. (Adaptado de OIE *Terrestrial Manual*, 2013).

9. Justificativa

O Brasil detém o maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 do mundo, com aproximadamente 2,5 milhões de casos. O potencial de disseminação deste retrovírus por meio da transfusão sanguínea incitou o início da triagem sorológica em bancos de sangue. De acordo com a Portaria nº 1.376 (19/11/1993) do Ministério da Saúde, a triagem para HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue tornou-se obrigatória desde 1993. No entanto, ainda não há um algoritmo definido para o diagnóstico desta infecção. Os métodos comumente empregados na etapa de triagem são

os testes de EIA seguido do WB, utilizado como confirmatório. Entretanto, este algoritmo resulta em 30% de resultados inconclusivos ou indeterminados. Ainda, apesar da disponibilidade dos testes sorológicos para diagnosticar a infecção pelo HTLV, esta não pode ser detectada durante o período de pré-soroconversão (janela imunológica), que pode variar de 36 a 72 dias, ou quando a resposta imunológica é deficiente. A qualidade e segurança das transfusões sanguíneas estão diretamente relacionadas à identificação e remoção das unidades com potencial infeccioso. Portanto, o desenvolvimento de ferramentas moleculares altamente sensíveis e específicas em complemento ou substituição ao teste de WB torna-se necessário.

Estudos mostram a importância da transmissão vertical do HTLV, os quais geraram projetos de leis (estadual e federal) para a inclusão da sua triagem sorológica nos exames pré-natal em hospitais públicos. Esta medida reduziria a transmissão da infecção na fase gestacional e principalmente no aleitamento materno, que é a principal via de transmissão para as crianças. Adicionalmente, o diagnóstico molecular pode facilitar a identificação de lactentes infectados por transmissão vertical, uma vez que as provas sorológicas nessa situação específica não permitem descartar a presença de anticorpos maternos, transferidos passivamente por via transplacentária.

A rede de captação e transplante de órgãos (OPTN) exige que os potenciais doadores sejam submetidos ao teste de triagem para HTLV-1/2. Os atuais métodos sorológicos são sensíveis e específicos, porém, quando aplicado a uma população com baixa prevalência desta infecção, a maioria dos resultados regentes na sorologia é falso positivo. Estes resultados levam à diminuição do número de doadores, o que eleva o tempo e a lista de espera, culminando no aumento da mortalidade dos pacientes.

Nesta última década, demonstrou-se que a tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos (do inglês *Nucleic Acid Technology*, NAT) pode ser rápida e de baixo custo, bem como ser amplamente utilizada na identificação precoce da infecção pelo HIV e HCV, entre outras infecções virais. Atualmente, não existe nenhuma plataforma NAT comercial disponível para HTLV-1/2. A implementação desta tecnologia poderia sobrepor-se a todas estas desvantagens metodológicas mencionadas anteriormente, permitindo a conclusão segura do diagnóstico, bem como aumentar a segurança de transplante de órgãos sólidos e transfusional. Além disso, a identificação de gestantes infectadas associada à interrupção do aleitamento materno impactaria diretamente na redução da transmissão deste retrovírus. Portanto, o desenvolvimento e a validação

desta plataforma (NAT) para o diagnóstico confirmatório *in vitro* da infecção pelo HTLV-1/2 pode ser um passo expressivo para o fortalecimento da capacitação tecnológica no Brasil. Ademais, contribui para a economia de divisas do país, pois permitirá o acesso ao diagnóstico confirmatório da infecção que apresenta alto custo, por se tratar de métodos importados.

Objetivos

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Desenvolver e validar uma plataforma molecular (NAT) utilizando a tecnologia da PCR em tempo real para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2 para a conclusão segura do diagnóstico desta infecção.

2. Objetivos específicos

- Definir a região gênica alvo do HTLV-1/2 para proposição dos *primers* e sondas que serão utilizadas para o diagnóstico;
- Avaliar e padronizar o método de extração de DNA;
- Desenvolver e padronizar os controles positivos e negativos;
- Desenvolver e padronizar o controle interno de reação;
- Padronizar a reação de PCR em tempo real no formato *multiplex*;
- Produzir e validar lote de reagentes e controles;
- Realizar os processos de validação aplicados a testes diagnósticos.

Materiais e Métodos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental foi realizado de acordo com a figura 6.

Figura 6. Fluxograma do delineamento experimental. Todos procedimentos realizados neste trabalho estão descritos a seguir.

1. Casuística

Neste estudo foi utilizado um total de 348 amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2, as quais foram obtidas a partir das seguintes instituições.

1.1 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP)

Foram coletadas 68 amostras de sangue total de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes da Ambulatório de Neurologia Tropical (NTR). Essas amostras foram avaliadas quanto à presença de anticorpos específicos anti-HTLV-1/2 pelo método imunoenzimático (EIA) de terceira geração e confirmadas pelo método de *Western Blot* (WB) e/ou *nested* PCR. Após a caracterização dessas amostras, foi realizada extração de DNA, de acordo com o item 5.2. O DNA extraído a partir das amostras HTLV-1/2 positivas, foi utilizado para a avaliação da sensibilidade diagnóstica.

Para avaliação da especificidade analítica e diagnóstica do teste, 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite B (HBV) e 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite C (HCV) foram coletadas, submetidas extração de DNA de acordo com o item 5.1. Estes pacientes são assistidos pela Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) (HIV) e do ambulatório de Gastroenterologia (HBV e HCV). Estes pacientes foram previamente submetidos aos testes sorológicos para detecção de anticorpos e/ou antígenos para HIV, HBV e HCV por essa instituição.

1.2 Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Foram coletadas 131 amostras obtidas de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 acompanhados no Ambulatório de HTLV, as quais foram submetidas aos testes sorológicos para a detecção de anticorpos e/ou antígenos para HTLV-1/2, HIV, HBV e HCV, e extração de DNA de acordo com o item 5.2. Os testes confirmatórios WB e/ou *nested* PCR foram previamente realizados na instituição de origem. Essas amostras foram utilizadas na avaliação da sensibilidade diagnóstica do teste.

1.3 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz da Bahia

Foram coletadas 149 amostras de sangue total de pacientes infectados pelo HTLV-1/2. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA de acordo com o item 5.2 e, posteriormente, utilizadas na avaliação da sensibilidade diagnóstica do teste. Todas as amostras foram previamente avaliadas, pela instituição de origem, quanto à presença de anticorpos e/ou antígenos específicos anti-HTLV-1/2, HIV, HCV e HBV pelo método imunoenzimático (EIA). Todas as amostras foram confirmadas pelo *Western Blot* (WB).

1.4 Hemocentro de Ribeirão Preto

Para compor o grupo controle, foram coletadas 198 amostras de candidatos à doação de sangue. Essas amostras foram destinadas a sorologia para a pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 e à extração de DNA de acordo com o item 5.2, para posterior utilização no ensaio de especificidade diagnóstica.

Todas as amostras de sangue periférico foram coletadas a partir de punção venosa e acondicionadas em dois tubos diferentes. O primeiro, sem anticoagulante, foi destinado à sorologia e *Western Blot* (WB), enquanto o segundo, contendo o anticoagulante etilenoaminotetracético (EDTA), foi destinado aos testes moleculares. Todas as amostras dos indivíduos portadores do HTLV-1/2 incluídos neste estudo apresentaram o teste sorológico EIA reagente. Para a confirmação dos resultados reagentes na sorologia, foi realizado o método WB e/ou *nested* PCR. Apesar de submetidas a testes confirmatórios, algumas amostras permaneceram sem definição do tipo viral ou indeterminadas.

1.5 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética do HC-FMRP e aprovado sob o número de processo 12027/2009. Os indivíduos incluídos neste estudo foram informados quanto ao procedimento de coleta e utilização da amostra biológica, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos I, II, III e IV).

2. Sorologia para HIV, HCV, HBV e HTLV-1/2

As amostras provenientes do Instituto Emílio Ribas foram avaliadas quanto: i) presença de anticorpos específicos anti-HTLV-1/2 pelo método imunoenzimático (EIA) Murex HTLV I+II (DiaSorin), ii) presença do antígeno p24 e de anticorpos contra o HIV por meio do imunoensaio de micropartículas de quimioluminescência Architect HIV Ag/Ab Combo (Abbott); iii) presença do antígeno de superfície do HBV pela técnica imunoenzimática MONOLISA® (Bio-Rad); iv) presença de anticorpos dirigidos contra o HBV pela técnica imunoenzimática MONOLISA® (Bio-Rad); v) detecção de anticorpos e antígenos do capsídeo viral do HCV pela técnica imunoenzimática MONOLISA® (Bio-Rad).

As amostras dos pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes da Clínica de Neurologia Tropical (NTR) e dos candidatos a doação de sangue foram avaliadas quanto presença de anticorpos específicos anti-HTLV-1/2 pelo método imunoenzimático (EIA) Murex HTLV I+II (DiaSorin).

Os procedimentos de reação e os resultados foram conduzidos e avaliados pelo Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto de acordo com os procedimentos operacionais estabelecidos pelo laboratório e recomendações do fabricante.

3. *Western Blot* para HTLV-1/2

As amostras dos pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Ambulatório de Neurologia Tropical (NTR) foram submetidas ao método confirmatório de *Western Blot* (WB) (HTLV Blot versão 2.4, Genelabs Diagnostics). As amostras foram classificadas de acordo com o padrão de reatividade como: positivas para HTLV-1, na presença de reatividade para produtos do *gag*, p19 e/ou p24, e para dois produtos do *env*, GD21 e rgp46-I; positiva para HTLV-2, na presença de reatividade para produtos do *gag*, p19 e/ou p24, e para dois produtos do *env*, GD21 e rgp46-II; positiva para HTLV, quando há presença de reatividade para produtos do *gag*, p19 e/ou p24, e para GD21; indeterminadas, presença de bandas específicas, porém sem ter alcançado os critérios descritos de positividade; negativo, na ausência das bandas virais específicas. Devido à indisponibilidade para a realização do método de WB para todas as amostras, algumas foram submetidas à técnica de *nested* PCR para a confirmação da infecção.

4. *Nested* PCR para HTLV-1/2

A metodologia de *nested* PCR foi utilizada para confirmar as amostras reagentes na sorologia que não foram submetidas ao WB. Foram amplificadas as regiões *tax* e LTR do genoma do HTLV-1 e as regiões LTR, *pxA* e *pxB* do genoma do HTLV-2 utilizando os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de *nested* PCR para HTLV-1/2.

Tipo Viral	Gene	Posição do primer	Primer	Sequência (5'-3')
HTLV-1	<i>tax</i>	Externo	PX01	TCG AAA CAG CCC TGC AGA TA
			PX02	TGA GCT TAT GAT TTG TCT TCA
		Interno	PXI01	ATA CAA AGT TAA CCA TGC TT
			PXI03	AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT
	LTR	Externo	LTR1	CAT TTC TAC TCT CAC ACG GCC TCA TAC AGA CTC TT
			LTR2	CGC AGT TCA GGA GGC ACC AC
		Interno	LTRN1	GAA CGC GAC TCA ACC GGC GTG GAT
			LTRN2	TTG AAG AAT ACA CCA ACA TCC C
HTLV-2	LTR	Externo	BSQF6	CAG GGC GAG TCA TCG ACC CAA AAG
			BSDR3	GAA GAC AAT GCT CCT AGG GCG GGC
		Interno	BSQF2	ACC GTC TCA CAC AAA CAA TCC C
			BSDR4	GCG GGC CTG CCT ATA GCA ATA
	<i>pxA</i>	Externo	Px101	GGC AAT CTC CTA AAA TAG TCT
			Px102	TGT GTG TAG GAA CAT TTT GTA
		Interno	Px103	TTA CAA TCC TGT CTC CTC TCA
			Px104	AAG TTC TTC TAA TCG TTT TAG
	<i>pxB</i>	Externo	Px105	GCT TTC CCC ACC CAT GAC ATG
			Px106	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA
		Interno	Px107	ACC CCA TGT CAT ATT CTG CCA
			Px108	AGC CTT TAC TTG GGA TTG TTT

A reação foi realizada em um volume total de 50 μ L contendo 100-200 ng de DNA genômico, 0.25 pmol de cada *primer*, 0.2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (Perkin Elmer Cetus) e água ultrapura para completar o volume final da reação.

As reações foram realizadas em termocicladores GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems) e as condições de termociclagem foram 96°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 52-61°C durante 1 minuto e 15 segundos, 72°C durante 1 minuto e 50 segundos e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. O produto obtido nesta primeira amplificação (3 μ L) foi utilizado para a segunda reação de PCR, utilizando-se o par de *primers* internos e as mesmas condições de ciclagem. Por fim, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose à 1% e revelado por brometo de etídeo.

5. Padronização da extração de DNA a partir do sangue total e *buffy coat*

Para a padronização da extração de DNA, 50 amostras foram extraídas com três *kits* de fabricantes distintos (A, B e C). Para tanto, três tubos de sangue contendo o anticoagulante EDTA foram coletados de cada indivíduo e destinados a um *kit* específico. A fim de minimizar variáveis experimentais, todas as amostras foram processadas simultaneamente. Todos os *kits* avaliados empregavam o método de extração baseado em coluna compostas por membrana de sílica e apresentam pequenas variações quanto ao processo de extração. Os protocolos descritos a seguir foram utilizados para a extração de DNA.

5.1 Fabricante A

As amostras de sangue foram submetidas à homogeneização durante 5 minutos em homogeneizador circular de sangue. Em seguida, uma alíquota de 200 μ L de sangue foi transferida para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. O sangue restante foi submetido à centrifugação a 2000 x g durante 10 minutos para a obtenção do *buffy coat*. Com o auxílio de um micropipetador automático, 30 μ L de *buffy coat* foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL e o volume foi completado para 200 μ L com tampão PBS (1X). As etapas subsequentes são comuns para a extração de DNA a partir de sangue total e *buffy coat*. A cada tubo de polipropileno, foram adicionados 20 μ L de proteinase K e 200 μ L do tampão A de lise. Os tubos foram homogeneizados em vortex durante 5

segundos com posterior incubação a 56°C por 15 minutos. Durante o período de incubação, o sistema foi agitado cinco vezes em vortex. A amostra foi submetida à rápida centrifugação para evitar a formação de aerossóis. Foram adicionados 400 µL de tampão B6 de ligação seguida de homogeneização em vortex durante 5 segundos. A amostra foi novamente submetida à rápida centrifugação para evitar a formação de aerossóis. Todo o volume de amostra foi transferido para uma coluna de membrana de sílica a qual foi incubada por 1 minuto a temperatura ambiente. Após incubação, a coluna foi submetida à centrifugação a 13.000 x g por 2 minutos. O produto filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 2 mL, ao qual foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem I e submetida à centrifugação a 13.000 x g durante 1 minutos. O produto filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 2 mL. Foram adicionados 800 µL do tampão de lavagem II e centrifugou-se a 13.000 x g durante 1 minuto. O produto filtrado foi novamente descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 2 mL, submetida à centrifugação a 16.900 x g durante 4 minutos para eliminação completa do etanol. A coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, adicionou-se 100 µL de água livre de nucleasse pré aquecida a 56°C e o sistema foi submetido à centrifugação a 8.000 x g durante 1 minuto para a eluição do DNA.

5.2 Fabricante B

As amostras de sangue foram submetidas à homogeneização durante 5 minutos em homogeneizador circular de sangue. Em seguida, uma alíquota de 200 µL de sangue foi transferida para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. O sangue restante foi submetido à centrifugação a 2000 x g durante 10 minutos para a obtenção do *buffy coat*. Com o auxílio de um micropipetador automático, 200 µL de *buffy coat* foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. As etapas subsequentes são comuns para a extração de DNA a partir de sangue total e *buffy coat*. Cada tubo de polipropileno, foi adicionado 20 µL de proteinase K seguida de homogeneização. Adicionou-se 200 µL do tampão de lise de células (CLD) nos tubos e homogeneizou-se durante 15 segundos em vortex com posterior incubação a 56°C por 10 minutos. As amostras foram submetidas à rápida centrifugação para evitar a formação de aerossóis. Foram adicionados 250 µL de tampão de ligação (BBA) seguida de homogeneização em vortex durante 15 segundos. As

amostras foram novamente submetidas à rápida centrifugação para evitar a formação de aerossóis. Todo o sistema foi transferido para uma coluna de membrana de sílica e submetido à centrifugação a 16.900 x g por 1 minuto. O produto filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 µL do tampão de lavagem de coluna (CWD) e submetida à centrifugação a 16.900 x g durante 3 minutos. Este passo foi repetido duas vezes, totalizando três lavagens. A coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, adicionou-se 100 µL de água livre de nuclease e o sistema foi submetido à centrifugação a 16.900 x g durante 1 minuto para a eluição do DNA.

5.3 Fabricante C

As amostras de sangue foram submetidas à homogeneização durante 5 minutos em homogeneizador circular de sangue. Em seguida, uma alíquota de 200 µL de sangue foi transferida para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. O sangue restante foi submetido à centrifugação a 2.000 x g durante 10 minutos para a obtenção do *buffy coat*. Com o auxílio de um micropipetador automático, 200 µL de *buffy coat* foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 mL. As etapas subsequentes são comuns para a extração de DNA a partir de sangue total e *buffy coat*. Antes de iniciar o processo de extração, foram adicionados ao sangue total, 20 µL de proteinase K seguida de homogeneização. Adicionou-se 200 µL do tampão de lise (AL), homogeneizou-se durante 15 segundos em vortex com posterior incubação a 56 °C por 10 minutos. A amostra foi submetida à rápida centrifugação e à mistura foram adicionados 200 µL de etanol P.A, seguida de homogeneização em vortex durante 15 segundos. Todo o sistema foi transferido para uma coluna de extração e submetido à centrifugação a 6.000 x g durante 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL limpo o qual foram adicionados 500 µL de *buffer* AW1 e assim foi submetida à centrifugação a 6.000 x g durante 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL limpo no qual foram adicionados 500 µL de *buffer* AW2. Em seguida, o sistema foi submetido à centrifugação 16.900x g durante 3 minutos. A coluna foi novamente transferida para um tubo de 1,5 mL limpo, adicionou-se 100 µL de água livre de nuclease e o sistema foi incubado à temperatura ambiente durante 1 minuto para completa eluição do DNA.

As luvas de látex utilizadas para a manipulação de amostras biológicas foram substituídas a cada passo do processo de extração que envolvia manipulação e abertura dos tubos, a fim de minimizar a contaminação cruzada. As amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria (UV) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento Nanodrop 2000c *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). As quantificações de DNA obtidas a partir dos diferentes *kits* testados e diferentes fontes (sangue total e *buffy coat*) e pureza, dada pela razão das absorbâncias de 280 nm e 260 nm, foram comparadas. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

6. Análise *in silico* para definição da região alvo – Desenho de *primers* e sondas

Para definição da região gênica viral foram realizados alinhamentos múltiplos com as sequências do genoma total do HTLV-1 e HTLV-2 disponíveis em um banco de dados público com auxílio do *software* BioEdit (versão 7.0.5.3), e Mega (versão 5-1993/2011), os quais utilizam o algoritmo Clustal W. Os números de acesso das sequências utilizadas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Isolados de HTLV-1, HTLV-2 utilizados no múltiplo alinhamento.

Isolado	Origem	Número de Acesso (<i>GenBank</i>)	Autor	Tipo viral
B1033-2009	Japão	AB513134	Fanet <i>et al.</i> , 2010	HTLV-1
RKI3-Ger	Alemanha	AF042071	Ellerbroket <i>et al.</i> , 1998	HTLV-1
-	América do Norte	NC_001436	Petropoulos <i>et al.</i> , 2010	HTLV-1
-	América do Norte	AF139170	Waziriet <i>et al.</i> , 1996	HTLV-1
-	América do Norte	AF033817	Petropoulos <i>et al.</i> , 2004	HTLV-1
WHP	China	AF259264	Cao <i>et al.</i> , 2000	HTLV-1
-	Japão	J02029	Seikiet <i>et al.</i> , 1999	HTLV-1
-	Caribe	D13784	Maliket <i>et al.</i> , 1988	HTLV-1
BRRP438	Brasil	AY563954	Kashima <i>et al.</i> , 2004	HTLV-1
-	Brasil	AY563953	Kashima <i>et al.</i> , 2004	HTLV-1
-	América do Norte	L03561	Zhao <i>et al.</i> , 1993	HTLV-1
ATL-YS	América do Norte	U19949	Chouet <i>et al.</i> , 1996	HTLV-1
-	França	L36905	Bazarbachiet <i>et al.</i> , 1996	HTLV-1
-	-	M86840	Retzelet <i>et al.</i> , 1990	HTLV-1
Tan90	África	AF074966	Saksena <i>et al.</i> , 1993	HTLV-1
Mel5	Melanésia	L02534	Gessain <i>et al.</i> , 1993	HTLV-1
Pygmy 550602	África	GU212854	Mauclere <i>et al.</i> , 2011	HTLV-2
-	-	NC_001488	Shimotohno <i>et al.</i> , 1985	HTLV-2
-	Brasil	AF139382	Lewis <i>et al.</i> , 2000	HTLV-2
G2	Venezuela	AF074965	Dube <i>et al.</i> , 1999	HTLV-2
-	-	AF412314	Glaser <i>et al.</i> , 2001	HTLV-2
K96	Brasil	AF326584	Covas <i>et al.</i> , 2003	HTLV-2
G12	Panamá	L11456	Pardiet <i>et al.</i> , 1993	HTLV-2
-	-	M10060	Shimotohno <i>et al.</i> , 1984	HTLV-2
RP329	Brasil	AF326583	Covas <i>et al.</i> 2004	HTLV-2
HTLV-II-Gab	África	Y13051	Letourneuret <i>et al.</i> 1998	HTLV-2
-	-	L20734	Lee <i>et al.</i> , 1993	HTLV-2
PatientGu	Itália	X89270	Salemiet <i>et al.</i> , 1996	HTLV-2
pygmy2	África	Y14365	Vandamme <i>et al.</i> , 1998	HTLV-2

Todos os genomas completos depositados no *GenBank* foram utilizados para o alinhamento.

Os *primers* e sondas foram confeccionados, baseado nas recomendações descritas a seguir. Para os *primers*, a temperatura de *melting* (T_m) foi entre 58 e 60°C, além de ser

aproximadamente 10°C abaixo da T_m das sondas, a fim de garantir que a sonda se ligue ao *template* antes dos *primers*. As últimas bases da extremidade 3' foram compostas com o menor número possível de bases citosina (C) e/ou guanina (G), o que reduz a formação de produtos não específicos. O conteúdo de G/C ficou entre 61 e 71%, dentro da faixa recomendada (30 a 80%). As sondas foram desenhadas o mais próximo possível da região de ligação dos *primers forward* ou reverso para melhorar a eficiência das reações. A T_m foi definida entre 68 e 70°C e o conteúdo de G/C ficou entre 47 e 69%. Com a finalidade de evitar o efeito *quencher*, sondas que continham G na extremidade 5' foram descartadas. O sistema *minor groove binder* (MGB) foi utilizado para desenho das sondas. Este sistema permite o aumento da T_m da sonda sem aumentar o tamanho da mesma, o que permitiu a obtenção de sondas mais curtas (13 a 20 bases).

Um total de quatro conjuntos de *primers* desenhados para a metodologia de SYBR® *Green* dirigidos para as regiões *tax* e *env*, e seis conjuntos de *primers* e sondas confeccionados para metodologia TaqMan® com alvo nas regiões *tax*, *gag*, *pol*, e *env* foram avaliados. Esses ensaios foram padronizados, no entanto, apresentaram resultados insatisfatórios no processo de validação. Somente o conjunto de *primers* e sondas TaqMan® dirigidos para a região viral *pol* mostrou-se adequado, e, portanto, a utilização dos outros conjuntos foi descontinuada.

7. Controles Positivos: cultivo e expansão das linhagens celulares MT-2 e Gu

A linhagem celular MT-2 consiste em linfoblastos isolados a partir de um indivíduo portador de ATLL (número de catálogo 93121518/ECACC). Esta linhagem contém o HTLV-1 integrado ao seu genoma, apresentando 2,1 cópias virais por células (Albrecht *et al.*, 1998). A linhagem Gu, originada a partir da infecção *in vitro* da linhagem celular BJAB, contém 8,3 cópias do HTLV-2 integrado ao seu genoma (Moens *et al.*, 2009). Esta linhagem foi cedida gentilmente pelo *Rega Institute for Medical Research* - Katholieke Universiteit, Leuven, Bélgica. As linhagens celulares MT-2 e Gu foram cultivadas em garrafas de 15 cm² (Greiner Bio One) com 15 mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10 % (Hyclone); 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina (Invitrogen). As culturas foram mantidas em incubadoras Steri-cult 200 Thermoform (Forma Scientific) à temperatura de 37°C, 5% CO₂ e 85% de umidade relativa do ar.

Após a expansão, as células foram coletadas em tubos de polipropileno de 15 mL, lavadas com tampão PBS (1X) por centrifugação a 200 x g durante 10 minutos, ressuspensas em PBS (1X) e contadas em câmara de Neubauer.

7.1 Extração de DNA a partir das linhagens celulares

Para a extração de DNA, foram utilizadas aproximadamente 2×10^7 células ressuspensas em 1 mL de PBS (1X). As células foram transferidas para um tubo de polipropileno de 1,5 mL e submetidas à centrifugação durante 5 minutos a 300 x g. Após centrifugação, retirou-se o sobrenadante, permanecendo 200 µL no tubo, que em seguida foi transferido para um tubo de polipropileno de 15 mL.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit *Gentra Puregene cell* (Gentra Systems), seguindo as instruções do fabricante. Adicionou-se 3 mL de solução de lise de células e, homogeneizou-se em vortex por 10 segundos. Foram adicionados 15 µL de RNase, homogeneizando-se por inversão cerca de 25 vezes. Essa mistura foi incubada a 37°C durante 5 minutos e rapidamente resfriada em gelo durante 3 minutos. Em seguida, 1 mL de solução precipitante de proteínas foi adicionado seguida de agitação vigorosa em vortex durante 20 segundos e posterior centrifugação a 2000 x g durante 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de polipropileno de 15 mL, ao qual foram adicionados 3 mL de isopropanol e homogeneizado por inversão cerca de 50 vezes para a precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 2000 x g e os sobrenadantes foram descartados. Para a lavagem do *pellet* de DNA, foi acrescentado 3 mL de etanol a 70% e o sistema foi homogeneizado várias vezes para uma eficiente lavagem. O DNA foi coletado e transferido para tubo de 1,5 mL estéril. Após a evaporação do etanol, o DNA foi ressuspensão em 300 µL de água deionizada e incubado a 65°C por 1 hora para completa eluição do DNA. Após a extração, o DNA foi quantificado por meio de espectrofotometria (UV) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento Nanodrop 2000c *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). O DNA armazenado a -20°C até o momento do uso.

7.2 Produção de lote dos controles positivos

O primeiro lote de controles positivos (lote 001) foi preparado a partir do DNA extraído das linhagens celular MT-2 e Gu de acordo com o item 7.1. Para tanto, quatro alíquotas contendo 200 μL de DNA da linhagem celular MT-2 foram transferidas para um tubo de polipropileno, livre de DNase, RNase e pirógenos, para obtenção de uma alíquota única. A concentração de DNA foi ajustada para aproximadamente 500 ng/ μL . Devido à heterogeneidade e viscosidade elevada da amostra, a mesma foi transferida para uma coluna composta por uma membrana de sílica e submetida à centrifugação a 16.900 x g durante 3 minutos. Após a centrifugação, a amostra foi quantificada por meio de espectrofotometria (UV) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm no equipamento Nanodrop 2000c *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). Os mesmos procedimentos foram adotados para a linhagem celular Gu. As alíquotas, únicas, obtidas a partir das linhagens MT-2 e Gu foram misturadas para a composição de um *pool* de controles positivos (MT-2+Gu). A partir deste *pool* foram preparadas 192 alíquotas de 15 μL e 192 alíquotas de 50 μL do controle positivo contendo 10^3 cópias virais a cada 5 μL , e 60 alíquotas de 50 μL do controle positivo contendo 10^5 cópias virais a cada 5 μL . As alíquotas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

8. Controle negativo

Para o controle negativo das reações de qPCR, cinco amostras de sangue total obtidas a partir de candidatos à doação de sangue foram misturadas (*pool*) e homogeneizadas durante 5 minutos em homogeneizador circular de sangue durante 5 minutos. Essas amostras não apresentaram reatividade sorológica ao teste imunoenzimático (EIA) para HTLV-1/2.

8.1 Produção de lote do controle negativo

Após homogeneização, foram feitas alíquotas do *pool* negativo em tubos de polipropileno de 1,5 mL de maneira que cada tubo permanecesse com 200 μL de *pool*, totalizando 20 tubos. A cada alíquota dispensada, o *pool* foi homogeneizado durante 30 segundos a fim de manter a homogeneidade do controle. As alíquotas foram

armazenadas a -20°C. A cada extração de DNA das amostras, o controle negativo foi incluído no processo.

9. Controle interno de amplificação (CI)

O controle interno (CI) é uma sequência de DNA que está presente na mesma reação de qPCR, na qual as amostras teste são amplificadas. Esta sequência é co-amplificada simultaneamente com a sequência alvo e tem como objetivo monitorar todo o processo, desde a extração de ácidos nucleicos até a análise final dos dados, e assim detectar possíveis falhas nos processos pré-analíticos e analíticos das amostras. O gene da beta-globina foi utilizado como CI nas reações de qPCR.

9.1 Desenho de *primers* e sondas para o CI

Baseado na sequência do gene da *beta-globina* humana com o número de acesso GU324922 e com o auxílio do *software* Primer Express®3.0 (Applied Biosystems), foi desenhado um par de *primers* e uma sonda no sistema TaqMan® MGB. As mesmas recomendações descritas no item 6 foram utilizadas para a confecção destes oligonucleotídeos.

10. Padronização das reações de qPCR no formato *singleplex*

10.1 Preparo da curva padrão a partir dos controles positivos

Considerando que o genoma humano haplóide pesa 3,3 pg e que a linhagem celular MT-2 possui aproximadamente uma cópia do HTLV-1 integrada ao seu genoma, procedeu-se os cálculos para obtenção de uma solução estoque contendo 10^5 cópias virais a cada 5µL de solução. Da mesma maneira foram realizados os cálculos para a linhagem celular Gu, no entanto, esta linhagem possui aproximadamente quatro cópias do HTLV-2 integrada ao seu genoma. Estes cálculos foram baseados na constante de Avogadro e na concentração de DNA das amostras avaliadas por espectrofotometria. As soluções estoques foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

10.2 Padronização das reações de qPCR nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*biplex* e *tríplice*)

Com o objetivo de avaliar a eficiência e correlação linear (R^2) das reações de qPCR no formato *singleplex* (presença de um alvo e uma sonda por reação) e *multiplex* (presença de mais de um alvo e mais de uma sonda por reação), foram realizadas diluições decimais seriadas (10^5 a 10^0 cópias virais/reação) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2). Estas diluições foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real no formato de curva padrão. As reações apresentavam como alvo somente HTLV-1 ou HTLV-2 ou controle interno (CI) (*singleplex*), HTLV-1 e IC ou HTLV-2 e ICI(*biplex*) ou HTLV-1, HTLV-2 e CI co-amplificados simultaneamente (*triplex*). As reações de PCR em tempo real foram padronizadas utilizando o *kit* TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e a amplificação e aquisição dos dados foram realizadas no ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Assim, cada reação de amplificação consistiu em 5 µL de DNA dos controles positivos e 12,5 µL *TaqMan*® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). A concentração utilizada das sondas foi 100 nM e a dos *primers* 250 nM. O volume de água foi ajustado a cada reação para um volume final de 25 µL/reação. As condições térmicas de ciclagem consistiram em um primeiro passo de ativação a 50°C por 2 minutos seguidos de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

10.3 Padronização das concentrações de sondas e *primers* utilizadas nas reações de qPCR

As reações de PCR em tempo real no formato *singleplex* foram padronizadas utilizando o *kit* TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e as condições térmicas de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados foram realizadas de acordo com o item 10.2. Cada reação de amplificação consistiu em 5 µL de DNA obtido a partir dos controles positivos MT-2 e Gu, 12,5 µL *TaqMan*® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). A concentração das sondas para HTLV-1 (marcada com o fluorocromo FAM™) e HTLV-2 (marcada com o fluorocromo VIC®) variou de 100 a 300 nM, já para o controle interno (CI) (marcada com o fluorocromo NED™), variou de 50 a 200 nM. As concentrações dos *primers* variaram de 250 a 500 nM para HTLV-1 e HTLV-2 e 125 a 250 nM para o CI. O volume de água foi ajustado a cada reação para um volume final de

25 µL/reação. Posteriormente, as concentrações de reagentes que apresentaram melhor desempenho foram avaliadas no formato *multiplex*.

10.4 Avaliação de insumos (*mix* para PCR em tempo real) provenientes de diferentes fabricantes

No intuito de melhorar as eficiências de reação, sensibilidade do teste, ganho de fluorescência, aliado a um menor custo, três fabricantes (A, B e C) de misturas para PCR em tempo real (*master mix*) foram avaliados em reações utilizando a plataforma TaqMan® nos formatos *singleplex* e *multiplex*. As condições térmicas de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados foram realizadas de acordo com o item 10.2. Cada reação de amplificação consistiu em 5µL de DNA obtido a partir do controle positivo (MT-2+Gu) e 12,5µL de *mix* para qPCR. A concentração das sondas para HTLV-1 (marcada com o fluorocromo FAM™), HTLV-2 (marcada com o fluorocromo VIC®) e IC (marcada com o fluorocromo NED™) foi 100 nM. A concentração dos *primers* foi 250 nM com exceção do *primer* reverso para HTLV-2 cuja concentração foi 500 nM. O controle positivo (MT-2+Gu) foi utilizado em diferentes quantidades nas reações de qPCR (10⁵, 10³, 10¹ cópias virais/reação). O volume de água foi ajustado a cada reação para um volume final de 25 µL/reação. Por apresentar melhor performance o *master mix* foi eleito para utilização nas reações de qPCR.

10.5 Padronização das concentrações de sondas e *primers* utilizadas nas reações de qPCR com o *master mix* do fabricante A

As concentrações das sondas e *primers* utilizados nas reações de qPCR foram novamente ajustadas. A mistura para qPCR (*master mix*) do fabricante A foi utilizada nessas reações, as quais foram realizadas nos formatos *singleplex* e *multiplex*. As condições térmicas de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados foram realizadas de acordo com o item 10.2. Cada reação de amplificação consistiu em 5µL de DNA obtido a partir dos controles positivos (MT-2 e Gu), 12,5 µL da mistura para qPCR do fabricante A, e 2,5 µL de água pura. As concentrações avaliadas da sonda para HTLV-1 (marcada com o fluorocromo FAM™) foram de 150 e 200 nM. Para a sonda HTLV-2 (marcada com o fluorocromo VIC®) as concentrações avaliadas foram 200, 225 e 250 nM, enquanto as concentrações avaliadas da sonda para o CI (marcada com o fluorocromo NED™), foram

de 100, 125, 150, 175 e 200 nM. As concentrações testada dos *primers* foram 250 e 500 nM para HTLV-1, HTLV-2 e CI, com exceção do *primer* reverso extra (reverso') para HTLV-2 que foi 500 nM. Posteriormente, as concentrações de reagentes que apresentaram melhor desempenho foram avaliadas no formato *multiplex*.

11. Produção de lote de *mix* (*primers* + sondas) para as reações de qPCR

Um mistura composta por todas as sondas e *primers* (*mix*) utilizados nas reações de qPCR foi produzida. Para tanto, os *primers forward* e reverso para HTLV-1 foram diluídos para a concentração de 25µM. O *primer forward* para HTLV-2 foi diluído para a concentração de 25µM, enquanto os *primers* reverso e reverso' foram diluídos para 12,5 µM. Os *primers forward* e reverso para o controle interno (CI) foram diluídos para a concentração de 12,5 µM. As sondas para HTLV-1 e IC foram diluídas para 10 µM e a sonda para HTLV-2 foi diluída para 11,25 µM. Todos os oligonucleotídeos foram misturados em um tubo de polipropileno de 12 mL livre de DNase, RNase e pirógenos a fim de constituir um *mix* único. Foi utilizada uma quantidade de água ultrapura para que as concentrações finais dos oligonucleotídeos fossem 500 nM dos *primers forward* e reverso para HTLV-1, 500 nM do *primer forward* para HTLV-2, 250 nM dos *primers* reverso e reverso' para HTLV-2 e 250 nM dos *primers forward* e reverso para o CI, 200 nM da sonda para HTLV-1 e IC e 225 nM da sonda para HTLV-2. O *mix* de oligonucleotídeos foi distribuído em alíquotas. A cada alíquota dispensada, o *mix* foi homogeneizado em vortex durante 10 segundos. As alíquotas foram envolvidas por papel alumínio e acondicionadas a -20°C até o momento do uso. O descongelamento dos oligonucleotídeos estoque, utilizados para a preparação do *mix*, foi realizado sobre gelo, e os mesmos foram homogeneizados durante 10 segundos antes dos procedimentos de diluição.

12. Validação do lote dos reagentes e controles

12.1 Avaliação da homogeneidade do *mix* (sondas+primers) e controles positivos e negativo

Para a avaliação da homogeneidade do *mix* (sondas+primers), cinco alíquotas foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas em reações de qPCR contendo 10^3 cópias virais do controle positivo.

A partir do lote de controle positivo, 10 alíquotas contendo 10^3 cópias virais foram escolhidas aleatoriamente para a avaliação da homogeneidade do lote em reações de qPCR. A avaliação da homogeneidade do lote de controle negativo foi realizada a partir da seleção aleatória de cinco alíquotas, as quais foram extraídas e submetidas às reações de qPCR.

12.2 Avaliação da estabilidade do *mix* (sondas+primers), controles positivos e *master mix*

Para avaliação da estabilidade, uma alíquota do *mix* foi descongelada e congelada por 18 vezes e submetida a reações de qPCR em um intervalo de 120 dias. Como controle, 18 alíquotas do *mix* foram descongeladas, uma por vez, e testadas em paralelo.

A estabilidade dos controles positivos foi avaliada por meio de uma alíquota a qual foi descongelada e congelada por 17 vezes e avaliada em reações de qPCR. Como controle, em paralelo, 17 alíquotas do controle foram descongeladas, uma por vez e submetidas a reações de qPCR. O intervalo de tempo decorrido para a avaliação da estabilidade dos controles positivos foi de 120 dias. A estabilidade foi determinada com base na viação dos *cycle threshold* (Ct).

A estabilidade da mistura para qPCR (*master mix*) utilizados nas reações foi avaliada por meio de uma alíquota, a qual foi submetida a processos de descongelamento e congelamento por 18 vezes em um intervalo de 120 dias. Como controle, paralelamente 18 alíquotas do *master mix* foram utilizadas em reações de qPCR.

13. Processo de validação aplicado a testes diagnósticos

13.1 Precisão

Nos testes de precisão são avaliados os parâmetros de repetibilidade (intra-ensaio) e reprodutibilidade (inter-ensaio). A repetibilidade refere-se à máxima concordância entre testes repetidos da mesma amostra sob as mesmas condições operacionais. Este teste foi realizado a partir de três diluições do controle positivo (MT-2+Gu) contendo 10^5 , 10^4 , 10^3 cópias virais/reação com cinco réplicas de cada diluição. Três corridas de qPCR foram realizadas no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador.

A reprodutibilidade avalia a máxima concordância entre resultados sucessivos do mesmo analito sob diferentes condições operacionais. Este teste foi realizado a partir de três diluições do controle positivo (MT-2+Gu) contendo 10^5 , 10^4 , 10^3 cópias virais/reação com cinco réplicas de cada diluição. Três corridas foram realizadas em dias alternados, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por três operadores distintos.

13.2 Robustez

A robustez de um teste refere-se ao potencial de contaminação cruzada das amostras negativas com amostras positivas por *carry-over*. Este parâmetro foi avaliado pelo método de “mesa de xadrez”, no qual uma amostra positiva é pipetada ao lado de uma amostra negativa ao longo da placa de reações de qPCR. As reações foram pipetadas tanto manualmente quanto por uma estação de trabalho autimatizada de pipetagem (*liquid handling*).

13.3 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica ou limite mínimo de detecção avalia a menor concentração ou quantidade que um método diagnóstico é capaz de detectar. Para atender a este parâmetro foram realizadas diluições do controle positivo (MT-3+Gu). A diluição estoque do controle positivo (MT-2+Gu) contendo 10^5 cópias virais foi submetida a uma primeira diluição de razão 10 para a obtenção de uma solução contendo 10^4 cópias virais, seguida de uma diluição de razão cinco, resultando em uma solução contendo

2000 cópias virais. A partir dessa solução, foram realizadas 11 diluições seriadas de razão dois, até a obtenção de uma solução contendo 0,976 cópias virais. A cada diluição realizada, a amostra foi homogeneizada em vortex durante 10 segundo, seguida de rápida centrifugação para minimizar a formação de aerossóis. Durante o processo das diluições, as ponteiros utilizadas nos pipetadores automáticos não foram trocadas. As diluições contendo 62,5, 31,25, 15,625, 7,81, 3,9, 1,95 e 0,975 cópias virais, em oito réplicas de cada diluição, foram submetidas as reações de qPCR as quais foram pipetadas por três operadores distintos em um único dia. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da sensibilidade analítica pelo método estatístico de regressão linear Probit em um intervalo de confiança de 95%, com o auxílio do *software Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 17.0 (SPSS Inc.). Dois lotes diferentes de *primers* e sondas foram submetidos à análise.

13.4 Especificidade analítica

A especificidade analítica corresponde à habilidade do teste em identificar exclusivamente a substância alvo ou organismo ao invés de substâncias ou organismos semelhantes em uma amostra. Para tanto, testes *in vitro* e *in silico* foram realizados. Para a validação *in vitro*, reações de qPCR contemplando os vírus HAV, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2, B19 foram realizados com painéis adquiridos do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC). Além do painel testado, 30 amostras de indivíduos infectados pelo HIV, 30 amostras de indivíduos infectados pelo HBV e 30 amostras de indivíduos infectados pelo HCV foram avaliadas em reações de qPCR. A validação *in silico* foi realizada pelo confronto das sequências dos *primers* e sondas contra um banco de dados público BLAST, a fim de verificar possíveis homologias com outros organismos.

13.5 Sensibilidade diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica de um método refere-se à probabilidade de um resultado positivo na presença da infecção, ou seja, avalia a capacidade do teste em detectar como positivo um indivíduo infectado (verdadeiro positivo). As amostras utilizadas para este teste mostraram-se reagentes na sorologia, *Western Blot* e/ou *nested* PCR positivas. Assim, 320 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 foram

testadas, dentre elas, 278 amostras HTLV-1 e 42 amostras HTLV-2. A fórmula para o cálculo da sensibilidade diagnóstica está descrita abaixo:

$$\text{Sensibilidade diagnóstica} = \frac{\text{Indivíduos verdadeiros positivos}}{\text{Indivíduos falsos negativos} + \text{Indivíduos verdadeiros positivos}}$$

As amostras que apresentaram *cycle threshold* (Ct) superior a 40 ou amplificação em somente uma das duplicatas foram consideradas negativas.

13.6 Especificidade diagnóstica

A especificidade diagnóstica de um método refere-se à probabilidade de um resultado negativo na ausência de infecção, ou seja, avalia a capacidade do teste em identificar como negativo um indivíduo sadio (verdadeiro negativo). Para tanto, 288 amostras de indivíduos que apresentaram perfil sorológico não reagente para HTLV-1/2 pelo teste imunoenzimático (EIA), foram submetidas às reações de qPCR. A fórmula para o cálculo da sensibilidade diagnóstica está descrita abaixo:

$$\text{Especificidade diagnóstica} = \frac{\text{Indivíduos verdadeiros negativos}}{\text{Indivíduos falsos positivos} + \text{Indivíduos verdadeiros negativos}}$$

As amostras que apresentaram *cycle threshold* superior a 40 foram consideradas negativas.

As condições de ciclagem, amplificação e aquisição dos dados de todo o processo de validação foram realizadas de acordo com o item 10.2. A concentração utilizada das sondas para HTLV-1 (FAM) e CI foi 200 nM e HTLV-2 (VIC) 225 nM. As concentrações dos *primers* para HTLV-1 foram 500 nM, HTLV-2 250 nM e IC 250 nM, com exceção do *primer* reverso' para HTLV-2 que foi utilizado na concentração de 500 nM. Todas as reações foram realizadas em duplicata e no formato *multiplex*.

Todas as reações de PCR em tempo real (qPCR) realizadas no processo de validação continham de 80 a 500 ng de DNA, com valor médio de aproximadamente 200 ng por reação.

14. Definição do *Threshold* para as reações de qPCR

O *threshold* das reações de qPCR foi definido com base na escolha automática dos *threshold* pelo *software* 7500 versão 2.0.5 (Applied Biosystems), obtidos a partir dos controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2, em 21 corridas de qPCR realizadas em dias alternados. Após o cálculo da mediana, o *threshold* para HTLV-1 foi definido em 0,518759 e para o HTLV-2 0,409368. Estes valores foram utilizados durante todo o processo de validação.

15. Definição do *cut off* para as reações de qPCR

Todas as corridas de qPCR foram realizadas em por meio de 45 ciclos de amplificação. Após o teste das amostras e controles negativos, observou-se raras amplificações tardias (*cycle threshold* > 40). Desta forma, amplificações acima deste valor de Ct foram consideradas negativas.

16. Análises estatísticas

A análise da precisão e a comparação dos formatos *singleplex* e *multiplex* das reações de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada por meio do cálculo da média, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos *cycle threshold* (Ct). A definição do *threshold* foi realizada por meio da avaliação da mediana dos Ct. O teste one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a eficiência dos métodos de extração, enquanto o teste *t* foi utilizado para avaliar a estabilidade dos controles e reagentes. Além disso, o método de regressão linear Probit foi utilizado para avaliar a sensibilidade analítica desta plataforma. O *software* GraphPad Prism 5 e o SPSS foram utilizados nas análises estatísticas.

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Avaliação do perfil sorológico das amostras do grupo controle e dos indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 das diferentes instituições

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP), Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz da Bahia e Hemocentro de Ribeirão Preto.

1.1 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP)

Para a realização deste estudo, foram utilizadas 68 amostras de DNA e plasma de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes da Clínica de Neurologia Tropical (NTR). Todas as amostras avaliadas apresentaram sorologia reagentes para o HTLV1/2. Para confirmação dos resultados, 31 amostras foram submetidas ao teste de *Western Blot* (WB). De acordo com o padrão de reatividade definido pelo fabricante, 21 amostras foram positivas para HTLV-1; quatro, positivas para HTLV-2; duas amostras foram classificadas como positivas para HTLV, porém sem definição do tipo viral e quatro amostras apresentaram padrão de reatividade indeterminado. Ainda, 37 amostras foram confirmadas pela metodologia de *nested* PCR, as quais 16 amostras mostraram-se positivas para HTLV-1 e 21 amostras positivas para HTLV-2 (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes da Clínica de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP submetidas aos testes confirmatórios de WB ou *nested* PCR.

Tipo viral	WB	<i>Nested</i> PCR	Total
HTLV-1	21	16	37
HTLV-2	4	21	25
HTLV-1 e 2	0	0	0
HTLV	2	0	0
IND	4	0	4
Total	31	37	68

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; IND: amostras indeterminadas; WB: *Western Blot*; HBV: vírus da hepatite B; HCV: vírus da hepatite C; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

Adicionalmente, 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite B (HBV) e 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite C foram avaliadas quanto à presença de anticorpos específicos para HTLV-1/2, as quais apresentaram resultados não reagentes.

1.2 Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Um total de 131 amostras provenientes de pacientes acompanhados no ambulatório de HTLV do Instituto Emílio Ribas foram submetidas ao teste imunoenzimático (EIA) para a detecção de anticorpos específicos para HTLV-1/2. Todas as amostras avaliadas mostraram-se reagentes, das quais, 95 foram confirmadas pelo método de WB. Baseado no padrão de bandas apresentado neste teste, as amostras foram classificadas como positivas para HTLV-1, HTLV-2, HTLV, sem definição do tipo viral, ou indeterminadas (Tabela 4).

Tabela 4. Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Instituto Emílio Ribas submetidas aos testes confirmatórios de WB ou *nested* PCR.

Tipo viral	WB	<i>Nested</i> PCR	Total
HTLV-1	69	33	102
HTLV-2	14	2	16
HTLV-1 e 2	0	1	1
HTLV	5	0	5
IND	7	0	7
Total	95	36	131

HTLV: vírus linfotrópico de células T humana; IND; amostras indeterminadas; WB: *Western Blot*; PCR: reação em cadeia da polimerase.

Ainda, 36 amostras foram confirmadas pela metodologia de *nested* PCR, e definidas como HTLV-1, HTLV-2 ou HTLV-1 e 2 positivas (Tabela 4). Além da avaliação sorológica para HTLV, as amostras foram testadas quanto à presença de outros agentes virais como HIV, HBV e HCV. Dentre as 131 amostras testadas, 81 mostraram-se reagentes exclusivamente para HTLV-1/2, enquanto 50 amostras apresentaram positividade para algum dos vírus pesquisados, atingindo o índice de 38,16% de co-infecção (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Instituto Emílio Ribas sem co-infecção.

Tipo Viral	Total de amostras
HTLV-1	67
HTLV-2	8
HTLV-1 e 2	0
HTLV	2
IND	4
Total	81

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; IND; amostras indeterminadas; WB: *Western Blot*.

Tabela 6. Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 e co-infectados com HBV, HCV e HIV provenientes do Instituto Emílio Ribas.

Tipo Viral	HIV	HBV	HCV	HIV+HBV	HIV+HCV	HBV+HCV	HIV+HCV+HBV	Total
HTLV-1	4	17	8	2	1	3	0	35
HTLV-2	1	0	0	0	2	0	5	8
HTLV-1/2	0	0	0	0	0	0	1	1
HTLV	1	1	1	0	0	0	0	3
IND	0	1	0	0	2	0	0	3
Total	6	19	9	2	5	3	6	50

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; IND: amostras indeterminadas; WB: *Western Blot*; HBV: vírus da hepatite B; HCV: vírus da hepatite C; HIV: vírus da imunodeficiência humana.

1.3 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (Bahia)

Um total de 149 amostras de sangue total de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 foram coletadas no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ) da Bahia. O soro foi avaliado quanto à presença de anticorpos e/ou antígenos específicos para o HTLV-1/2, HIV, HBV e HCV nessa instituição. As amostras mostraram-se reagentes exclusivamente para HTLV-1/2. Para a confirmação da sorologia, todas as amostras foram submetidas ao WB. Baseado no padrão de reatividade das bandas, 139 amostras foram definidas como HTLV-1; uma como HTLV-2; duas como HTLV-1 e HTLV-2; quatro amostras foram classificadas como HTLV, porém sem definição do tipo viral, e três amostras permaneceram com o padrão de reatividade indeterminado (Tabela 7).

Tabela 7. Amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 provenientes do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz da Bahia.

WB	n° amostras
HTLV-1	139
HTLV-2	1
HTLV-1 e 2	2
HTLV	4
IND	3
Total	149

HTLV: vírus linfotrópico de células T humana;
IND: amostras indeterminadas; WB: *Western Blot*.

Desta forma, neste estudo, foi utilizado um total de 348 amostras, das quais, 278 (79,88%) foram definidas como positivas para HTLV-1; 42 amostras (12,06%) positivas para HTLV-2; 11 amostras (3,60%) foram classificadas como HTLV, porém sem definição do tipo viral e 14 (4,02%) amostras permaneceram como indeterminadas (Tabela 8).

Tabela 8. Perfil das amostras obtidas a partir das diferentes instituições.

Instituição	HTLV-1	HTLV-2	HTLV-1 e 2	HTLV	IND	Total
Emílio Ribas	102	16	1	5	7	131
HC-FMRP	37	25	0	2	4	68
Fiocruz	139	01	2	4	3	149
Total	278	42	3	11	14	348

HC-FMRP: Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz; WB: *Western Blot*; PCR: reação em cadeia da polimerase; IND: indeterminadas.

1.4 Hemocentro de Ribeirão Preto

Para compor o grupo controle, foram coletadas 198 amostras de candidatos à doação de sangue. Essas amostras foram avaliadas quanto à presença de anticorpos específicos para HTLV-1/2 pelo método imunoenzimático (EIA), as quais apresentaram resultados não reagentes.

2. Padronização da extração de DNA: Avaliação de três kits

Com o objetivo de avaliar a eficiência, rendimento, reprodutibilidade e custo, três kits de extração produzidos por três fabricantes distintos (A, B e C) foram avaliados. As extrações foram realizadas a partir do sangue total, bem como do *buffy coat*. Assim, 50 amostras foram submetidas ao teste. Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria e avaliadas quanto ao rendimento e pureza, dada pela razão entre as absorbâncias de 260 nm (ácidos nucleicos) e 280 nm (proteínas). A média e o coeficiente de variação (CV) da concentração de DNA e pureza das amostras estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Média e o coeficiente de variação (CV) da concentração de DNA e pureza das amostras

Parâmetros Avaliados	Concentração DNA	Kit A BC	Kit A ST	Kit B BC	Kit B ST	Kit C BC	Kit C ST
Rendimento (ng/μL)	Média	61,97	58,41	82,19	55,14	106,3	47,69
	CV%	110,88	35,27	66,28	33,44	80,14	29,63
Pureza	Média	1,818	1,860	1,859	1,947	1,882	1,876
	CV%	6,37	3,61	14,15	1,81	3,09	2,10

CV: coeficiente de variação; BC: *buffy coat*; ST: sangue total.

O rendimento médio obtido a partir da extração do sangue total pelo kit A foi 58,41 ng/μL, kit B 55,14 ng/μL e kit C foi 47,69 ng/μL, enquanto o rendimento médio obtido a partir da extração do *buffy coat* pelo kit A foi 61,97ng/μL, kit B 82,19 ng/μL e kit C 106,3 ng/μL. A média de pureza do DNA, obtido a partir da extração do sangue total para o kit A foi 1,860, para o kit B 1,947 e para o kit C 1,876, enquanto a média de pureza obtido a partir da extração do *buffy coat* para o kit A foi 1,818, para o kit B 1,859 e para o kit C 1,882. A extração a partir do *buffy coat* apresentou elevada dispersão dos valores relativos à média quando comparados com a extração a partir do sangue total (Figura 7A).

Figura 7. Análise do rendimento dos kits de extração de diferentes fabricantes (A, B e C) a partir do sangue (ST) total e do buffy coat.(BC). (A) Comparação das concentrações de DNA obtidas com três diferentes kits de extração (A, B e C), a partir do sangue total e buffy coat. (B) Comparação das concentrações de DNA obtidas com três kits de extração (A, B e C), a partir do sangue total. As concentrações de DNA foram submetidas ao teste estatístico one-way ANOVA com pós teste de Boferroni * $p=0,0126$.

Os kits A, B e C foram comparados em relação o rendimento, considerando a extração a partir do sangue total. Foi observado uma diferença significativa ($p=0,0126$) entre os kits A e C (Figura 7B). Entretanto, não foi observado diferenças significativas entre os kits A e B e entre B e C (Figura 7B). Ao analisar as médias do rendimento, observou-se que o kit C apresentou a pior média de rendimento (47,29 ng/μL), enquanto os kits A e B apresentaram médias de rendimentos semelhantes (57,34 ng/μL e 54,65 ng/μL, respectivamente).

As amostras de sangue total foram comparadas quanto a pureza do DNA utilizando os kits A, B e C. Foi observado uma diferença significativa entre os kits A e B ($p<0,001$) e entre os kits B e C ($p<0,001$) (Figura 8B). Não houve diferença significativa entre os kits A e C (Figura 8B). Baseado na média, o kit B apresentou a melhor pureza entre os kits avaliados (média kit A=1,866; B=1,947; C=1,876) (Figura 8A).

Figura 8. Análise da pureza do DNA extraído com os *kits* de extração de diferentes fabricantes (A, B e C) a partir do sangue total (ST) e do *buffy coat* (BC). (B) Comparação das purezas de DNA obtidas com três *kits* de extração (A, B e C), a partir do sangue total. As purezas de DNA foram submetidas ao teste estatístico one-way ANOVA com pós teste de Boferroni *** $p < 0,001$.

3. Análise *in silico* para definição da região gênica alvo - Desenho de *primers* e sondas

3.1 Alinhamento múltiplo dos genomas do HTLV-1 e 2

Após análise dos alinhamentos múltiplos dos genomas completos dos dois tipos virais, o gene *pol* foi eleito para proposição de *primers* e sondas para as reações de PCR em tempo real (qPCR). Os oligonucleotídeos foram desenhados em regiões que apresentavam elevada similaridade entre os subtipos virais do HTLV-1 e HTLV-2, no entanto, baixa similaridade entre o HTLV-1 e HTLV-2 (Figura 9).

Figura 9. Alinhamento parcial do gene *pol* do HTLV-1 e HTLV-2. (A) *primers* e sonda para detecção do HTLV-1. (B) *primers* e sonda para detecção do HTLV-2. As caixas amarelas representam os sítios escolhidos para desenho dos *primers*. A caixa em verde representa o sítio para desenho da sonda para HTLV-1 e a caixa em vermelho representa o sítio para desenho da sonda para HTLV-2.

3.2 Desenho de sondas e *primers* no sistema TaqMan® para HTLV-1/2

Com o objetivo de desenhar *primers* e sondas utilizando o sistema Taqman® MGB®, um par de *primers* e uma sonda marcada com o fluorocromo FAM™ foram desenhados para a detecção do HTLV-1 e um par de *primers* e uma sonda marcada com o fluorocromo VIC® foram desenhados para a detecção do HTLV-2. A sequência dos oligonucleotídeos, bem como temperatura de *melting*, porcentagem de guanina (G) e citosina (C), marcação fluorescente e tamanho do *amplicon*, estão descritos na Tabela 10. Desta forma, tornou-se possível a detecção e discriminação simultânea entre dois tipos virais em uma única reação, no formato *multiplex*.

Tabela 10. Desenho de *primers* e sondas para a detecção do HTLV-1 e HTLV-2.

ID (MGB)	Sequência	Tm°C	%GC	Tam
HTLV-1 For_ <i>pol</i>	5' CAGCCCCTTCACAGTCTCTACTG 3'	59	57	23 bp
HTLV-1 Rev_ <i>pol</i>	5' AGAAGGATTTAAATATATTTGGTCTCGG 3'	58,5	32	28 bp
HTLV-1	5' FAM CCTTACAAAGGCATACTGAT MGB 3'	69	40	20 bp
HTLV-2 For_ <i>pol</i>	5' CAAGGTGATGTAACCCATTATAAGTACAA 3'	58,8	34	29 bp
HTLV-2 Rev_ <i>pol</i>	5' AACCGCACCGGAGAAGGT 3'	59,1	61	18 bp
HTLV-2	5' VIC AAATACAAATACTGCCTCCACGT MGB 3'	68	40	20 bp

ID: identificação; Tm: temperatura de *melting*; G: guanina; C: citosina; Tm: tamanho; bp: pares de base; MGB: *minor groove binder*. O *amplicon* gerado para HTLV-1 tem 75 pares de base e para HTLV-2 81 pares de base.

4. Desenho de *primers* e sonda para o gene da *beta-globina*

Com o objetivo de monitorar a extração de ácidos nucleicos até a análise final dos dados, o gene da beta-globina foi eleito como controle interno da reação (CI). Este gene, coamplificado juntamente com as sequências alvo, valida as reações negativas e demonstra a presença de inibidores ou falhas nos procedimentos durante os processo pré-analítico e analítico. Assim, com base na sequência nucleotídica do gene da beta-globina, foram desenhados um par de *primers* e uma sonda marcada com o fluoróforo NED™ específicos para esse gene (Tabela 11).

Tabela 11. Desenho de *primers* e sondas utilizados com alvo no gene da *beta-globina*.

ID (MGB)	Sequência	Tm°C	%GC	Tam
Globina For	5' TGAAGGCTCATGGCAAGAAA 3'	58	45	20 bp
Globina Rev	5' GGTGAGCCAGGCCATCAC 3'	59	67	18 bp
Globina <i>Probe</i>	5' NED TGCTCGGTGCCTTT MGB 3'	69.0	63	14 bp

ID: identificação; Tm: temperatura de *melting*; G: guanina; C: citosina; Tam: tamanho; bp: pares de base. O *amplicon* gerado para HTLV-1 tem 54 pares de base.

5. Padronização das reações de PCR em tempo real (qPCR) no formato *singleplex*

Com o objetivo de avaliar a cinética de reação e a qualidade dos *primers* e sondas, as eficiências e correlações lineares (R^2) das reações de amplificação foram avaliadas no formato *singleplex* (uma sonda e um alvo por reação). Para tanto, foram construídas curvas padrão por meio de diluições decimais seriadas (10^5 a 10^0 cópias virais/reação) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2). As eficiências para o conjunto de sondas e *primers* para o HTLV-1, HTLV-2 e controle interno (CI) foram superiores a 95% e as correlações (R^2) mostraram-se superiores a 0,99 (Figura 10).

Figura 10. Curvas de amplificação e curvas padrão no formato *singleplex*. Diluições decimais seriadas variando de 10^5 a 10^0 cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. (A) Curvas de amplificação para o HTLV-1. (B) Curva padrão para HTLV-1. (C) Curvas de amplificação para o HTLV-2. (D) Curva padrão para HTLV-2. (E) Curvas de amplificação para o controle interno. (F) Curva padrão para o controle interno.

6. Padronização das reações de PCR em tempo real (qPCR) no formato *multiplex*

Após padronização das reações de qPCR no formato *singleplex*, os formatos *biplex* (dois alvos por reação) e *triplex* (três alvos por reação) foram avaliados. Desta forma, diluições decimais seriadas (10^5 a 10^0 cópias virais/reação) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. A partir da curva padrão gerada, foi possível a avaliação das eficiências e correlações lineares (R^2) das

reações em todos os formatos. As reações foram realizadas no seguintes formatos: i) *biplex* contendo alvos e sondas para HTLV-1 ou HTLV-2 e CI; ii) *triplex* contendo alvos e sondas para HTLV-1, HTLV-2 e CI. As reações no formato *biplex* (HTLV-1 e CI) mostraram-se adequadas (Figura 11). As curvas para HTLV-2 das reações *biplex* (HTLV-1 e HTLV-2; HTLV-2 e CI) sofreram uma mudança em seu formato, tornando-se mais linear que sigmoide (Figura 11). No formato *triplex* (HTLV-1, HTLV-2 e CI), as curvas para HTLV-1 e CI mostraram-se adequadas, no entanto, as curvas para HTLV-2 sofreram acentuada mudança em sua forma e redução sensível da fluorescência como observado na figura 11.

Figura 11. Curvas de amplificação nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*biplex* e *triplex*). Diluições decimais seriadas variando de 10⁵ a 10⁰ cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações. (A) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para o HTLV-1. (B) Curvas de amplificação no formato *biplex* para o HTLV-1 e controle interno. (C) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para o HTLV-2. (D) Curvas de amplificação no formato *biplex* para o HTLV-2 e controle interno. (E) Curvas de amplificação no formato *biplex* para HTLV-1 e HTLV-2. (F) Curvas de amplificação no formato *triplex* para HTLV-1, HTLV-2 e controle interno.

O cycle threshold (Ct) das reações nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*triplex*) foram similares (Tabela 12).

Tabela 12. Comparação das reações de qPCR nos formatos *singleplex* e *triplex* (*multiplex*). Valores de *cycle threshold* e desvio padrão das diluições dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2). As diluições variaram de 10^5 a 10^0 cópias/reação.

Alvo	Valor de Ct					
	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0
HTLV-1						
<i>Singleplex</i>	20.362	23.894	27.318	31.067	34,041	36.705
<i>Triples</i>	20.422	23.992	27.402	31.256	35.233	37.015
DP	0.042	0.069	0.059	0.133	0.842	0.2194
HTLV-2						
<i>Singleplex</i>	23,765	27.042	30.761	34,041	37.67032	ND
<i>Triples</i>	23.629	27.243	30.766	35.07	36.53651	ND
DP	0.096	0.142	0.003288	0.728	0.801726	ND

HTLV: vírus linfotrófico de células T humanas; DP: desvio padrão; Ct: *cycle threshold*; ND: não detectado.

7. Padronização da concentração dos *primers* e sondas utilizados nas reações de qPCR

Na tentativa de melhorar as curvas e fluorescência no formato *multiplex*, com foco na curva para HTLV-2, diferentes concentrações de sondas foram testadas. As diluições dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) contendo 10^5 , 10^3 , e 10^1 cópias virais/reação foram utilizadas nas reações de qPCR. As reações foram realizadas nos formatos *singleplex* e *multiplex* (*biplex* e *triplex*). A figura 12 demonstra as concentrações de sondas avaliadas, que foram 100, 200 e 300 nM.

Figura 12. Curvas de amplificação no formato *singleplex* para HTLV-2. Cada reação foi realizada em duplicata e continha 10^5 , 10^3 e 10^1 cópias virais/reação. A curva em vermelho, representa a concentração de 100 nM da sonda, em amarelo, 200 nM e em verde, 300 nM. Nota-se que há aumento na intensidade de fluorescência (ΔRn) à medida que a concentração da sonda é aumentada.

Em todos os formatos, ao aumentar a concentração da sonda, notou-se um aumento gradual na fluorescência e ligeira redução de Ct. No entanto, as curvas para HTLV-2 no formato *multiplex*, sofreram mudança na forma e sensível queda na fluorescência, principalmente no formato *triplex*, como pode ser observado na figura 13. Como o aumento da concentração das sondas não resultou em alterações significativas no formato e fluorescência das curvas, principalmente para HTLV-2, outras estratégias foram adotadas na tentativa de melhorar as condições das reações.

Figura 13. Comparação entre as curvas de amplificação no formato *singleplex* e *multiplex* para HTLV-2. Cada reação continha 10^5 cópias virais/reação. (A) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para HTLV-2. (B) Curvas de amplificação no formato *biplex* para HTLV-2 e controle interno. (C) Curvas de amplificação no formato *triplex* para HTLV-1, HTLV-2 e controle interno. A concentração da sonda para HTLV-2 variou de 100 nM a 300 nM.

7.1 Desenho de um *primer* reverso extra (reverso') para HTLV-2

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade da reação para HTLV-2, foi desenhado um segundo *primer* reverso (Tabela 13).

Tabela 13. Desenho do segundo *primer* reverso para HTLV-2.

Identificação	Sequência	Tm °C	%GC	Tam
HTLV-2 Rev' <i>_pol</i>	5' AGAAACCAGCTGTGAGACTATCAGC 3'	59,1	48	25 bp

Tm: temperatura de *melting*; G: guanina; C: citosina; bp: pares de base.

Assim, dois *amplicons* de tamanhos diferentes são gerados (Figura 14) aumentando os alvos para ligação da sonda, o que gera um aumento na fluorescência e redução de Ct, como pode ser observado na Figura 15.

Figura 14. Esquema do segundo *primer* reverso para HTLV-2. Nota-se que com a utilização de dois *primers* reversos, dois *amplicons* de tamanho diferentes são gerados, e estes são alvos de uma única sonda. Com o aumento do número de *amplicons* gerados, mais sondas serão aneladas aos mesmos, proporcionando o aumento da fluorescência, redução no Ct, e consequentemente, aumento da sensibilidade.

Figura 15. Comparação entre as curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando um ou dois *primers* reversos para HTLV-2. As curvas de amplificação em vermelho são referente às reações contendo um *primer* reverso. As curvas de amplificação em verde referem-se a reações contendo dois *primers* reversos. Ao adicionar o segundo *primer* reverso à reação, notou-se o aumento da fluorescência associado a uma ligeira redução nos valores de *cycle threshold* (Ct).

7.2 Determinação das concentrações ideais para as reações de qPCR no formato *singleplex*

Utilizando o formato *singleplex*, diferentes condições das reações de qPCR foram testadas. Como controle positivo as diluições das linhagens celulares MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) contendo 10^5 , 10^3 , e 10^1 cópias virais/reação foram utilizadas. A concentração dos *primers* testados para as reações HTLV-1 e HTLV-2 foram 250 e 500 nM e sondas 100 e 200 nM e, para CI, 125 e 250 nM de *primers* e 50 e 100 nM de sonda. As melhores condições observadas para HTLV-1 foram 500 nM de *primers* e 200 nM de sondas, para HTLV-2 500 nM de *primer forward*, 250 nM dos *primers* reversos e 200 nM de sonda e para o CI, 250 nM de *primers* e 100 nM de sonda (Figura 16).

Figura 16. Curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando diferentes concentrações de *primers* e sondas. Três diluições (10^5 , 10^3 , e 10^1) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. (A) Curvas de amplificação para o controle interno. (B) Curvas de amplificação para HTLV-1. (C) Curvas de amplificação para HTLV-2. (D) Curvas de amplificação para HTLV-2.

7.3 Teste com as melhores concentrações de sondas e *primers* no formato *multiplex*

Após a padronização das melhores concentrações para as reações *singleplex*, procedeu-se o teste no formato *multiplex*. No entanto, como é possível observar nas figuras 17e 18, ao utilizar este formato, as curvas para as reações para HTLV-2 tornam-se mais lineares, e a redução de fluorescência continua a ser observada.

Figura 17. Curvas de amplificação utilizando as melhores condições obtidas nas reações de qPCR. Diluições decimais seriadas variando de 10^5 a 10^1 cópias virais/reacção dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações. (A) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para o HTLV-1 utilizando *primers* nas concentrações de 500 nM e sonda 200 nM. (B) Curvas de amplificação no formato *multiplex* para o HTLV-1 utilizando *primers* nas concentrações de 500 nM e sonda 200 nM e para o controle interno, utilizando *primers* nas concentrações de 250 nM e sonda 100 nM. (C) Curvas de amplificação no formato *singleplex* para o HTLV-2 utilizando o *primer forward* na concentração de 500 nM, *primers* reversos 250 nM e sonda 200 nM. (D) Curvas de amplificação no formato *multiplex* para o HTLV-2 utilizando o *primer forward* na concentração de 500 nM, *primers* reversos 250 nM e sonda 200 nM, e para o controle interno, utilizando *primers* nas concentrações de 250 nM e sonda 100 nM.

Figura 18. Curvas de amplificação no formato *multiplex* para a detecção simultânea dos três alvos utilizando diferentes concentrações de *primers* e *sondas*. Três diluições (10^5 , 10^3 , e 10^1) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR.

7.4 Avaliação de insumos provenientes de diferentes fabricantes

Um primeiro teste composto por reações de qPCR *singleplex* contendo 10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 cópias virais/ reação do controle positivo para HTLV-2 (Gu) foi realizado utilizando misturas para qPCR (*master mix*) dos fabricantes A, B e C. O melhor rendimento foi observado nas reações utilizando o *master mix* do fabricante A, observado na figura 19.

Figura 19. Curvas de amplificação utilizando *master mix* provenientes de diferentes fabricantes. Quatro diluições (10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2) do controle positivo Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. (A) Curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando o *master mix* produzido pelo fabricante A. (B) Curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando o *master mix* produzido pelo fabricante B. (C) Curvas de amplificação no formato *singleplex* utilizando o *master mix* produzido pelo fabricante C.

Desta forma, um segundo teste utilizando os *master mix* do fabricante C e B foi realizado nos formatos *biplex* e *triplex*, a partir de diluições dos controles para HTLV-1 (MT-2) e HTLV-2 (Gu). As diluições utilizadas foram de 10^5 , 10^3 , e 10^1 cópias virais/reação. Surpreendentemente, ocorreu alteração no formato da curva e na intensidade de fluorescência para HTLV-2, ao utilizar o *master mix* do fabricante A, tornando-se sigmoide e mais fluorescente que a curva para HTLV-1, quando testadas no formato *multiplex* contendo três alvos (Figura 20). Desta forma, optou-se por utilizar o *master mix* do fabricante A em detrimento do *master mix* da Applied Biosystems.

Figura 20. Curvas de amplificação utilizando *master mix* provenientes de diferentes fabricantes. Três diluições (10^5 , 10^3 e 10^1) dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR. (A) e (B) Curvas de amplificação no formato *multiplex* com dois alvos presentes (HTLV-2 e controle interno), utilizando o *master mix* produzido pelo fabricante C e A, respectivamente. (C) e (D) Curvas de amplificação no formato *multiplex* com dois alvos presentes (HTLV-1 e controle interno), utilizando o *master mix* produzido pelo fabricante C e A, respectivamente. (E) e (F) Curvas de amplificação no formato *multiplex* com três alvos presentes (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno), utilizando o *master mix* produzido pelo fabricante C e A, respectivamente. Notou-se que o *master mix* do fabricante A, proporcionou a maior intensidade de fluorescência e melhor curva sigmoide. A análise do *cycle threshold* (Ct) mostrou uma redução nos valores, o que indica melhor eficiência desse *master mix*.

8. Ajuste fino das concentrações das sondas e *primers* no formato *multiplex*

Após optar pelo uso do *master mix* do fabricante A, um ajuste fino das condições das reações *multiplex* de qPCR foi realizado. Para tanto, os *primers* para HTLV-1 foram utilizados nas concentrações de 250 e 500 nM e a sonda 100, 125, 150 175, e 200 nM, para HTLV-2, *primers* nas concentrações de 250 e 500 nM e sonda 200, 225 e 250 nM e para o CI, *primers* na concentração de 250 e sonda 100, 125, 150 e 200 nM. A melhor condição observada foi ao utilizar para HTLV-1, 500 nM de *primers* e 200 nM de sonda;

para HTLV-2, 500 nM de *primer forward*, 250 nM dos *primers* reversos e 225 nM de sonda, e para o CI, 250 nM de *primers* e 200 nM de sonda como pode ser observado na figura 21.

Figura 21. Curva de amplificação no formato *multiplex* com a presença de três alvos (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno). A diluição de 10^5 cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foi utilizada na reação de qPCR.

Assim, a partir das concentrações ideais de sondas e *primers* definidas, foram avaliadas as eficiências e correlações lineares das reações de qPCR por meio de curvas padrão a partir dos controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2. As eficiências para o conjunto de sondas e *primers* para o HTLV-1, HTLV-2 e controle interno (CI) foram superiores a 95% e as correlações (R^2) mostraram-se superiores a 0,99 (Figura 22).

Figura 22. Curvas de amplificação e curvas padrão no formato *multiplex* com a presença de três alvos (HTLV-1, HTLV-2 e controle interno). Diluições decimais seriadas variando de 10⁵ a 10¹ cópias virais/reação dos controles positivos MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2) foram utilizadas nas reações de qPCR.

Os parâmetros analisados mostraram-se adequados, assim, a plataforma diagnóstica foi devidamente padronizada no formato *multiplex* (*triplex*) como proposto neste estudo. Portanto, essa condição foi adotada nos processos de validação.

9. Validação do lote dos reagentes e controles

9.1 Avaliação da homogeneidade do *mix* (sondas + *primers*)

A homogeneidade do *mix* foi avaliada por meio de reações de qPCR, nas quais, os valores de *cycle threshold* (Ct) para HTLV-1 e HTLV-2 foram analisados. Para tanto, cinco de 20 alíquotas dos controles positivos contendo 10³ cópias virais/reação foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas nas reações de qPCR. A média, desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) entre as alíquotas estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Avaliação da homogeneidade do *mix* (primers+sondas).

HTLV-1 (alíquotas)	Média dos Ct	HTLV-2 (alíquotas)	Média dos Ct
1	31,942	1	31,723
5	31,968	5	31,839
2	32,084	2	31,750
7	31,989	7	31,805
3	31,893	3	31,707
Média	31,975	Média	31,765
DP	0,071	DP	0,056
CV%	0,2	CV %	0,2

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas.

O baixo valor de desvio padrão dos Ct entre as alíquotas avaliadas demonstra que o processo de produção e alíquotagem do *mix* foram homogêneos.

9.2 Avaliação da homogeneidade dos controles positivos e negativos

Com o objetivo de avaliar se a variabilidade entre as alíquotas dos controles positivos (Lote 001) poderiam ser desprezíveis, 10 de 96 alíquotas contendo 10^3 cópias virais foram escolhidas aleatoriamente, a partir do lote 001 e utilizadas em reações de qPCR. A partir dos valores de Ct para HTLV-1 e HTLV-2, foram calculados a média, desvio padrão e o CV (Tabela 15).

Tabela 15. Avaliação da homogeneidade dos controles positivos (lote 001)

HTLV-1 (alíquotas)	Média dos Ct	HTLV-2 (alíquotas)	Média dos Ct
146	31,700	146	31,368
138	31,372	138	31,183
163	31,530	163	31,161
155	31,300	155	30,997
173	31,392	173	31,145
100	30,852	100	30,925
118	31,711	118	31,611
127	31,775	127	31,664
129	31,672	129	31,293
176	31,259	176	30,933
146	31,700	146	31,368
138	31,372	138	31,183
Média	31,456	Média	31,228
DP	0,282	DP	0,246
CV%	0,897	CV%	0,788

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas.

Para a avaliação do lote do controle negativo, cinco de 20 alíquotas foram submetidas à extração e avaliadas em reações de qPCR, nas quais a média, o desvio padrão e o CV dos valores de Ct do controle interno foram calculados (Tabela 16).

Tabela 16. Avaliação da homogeneidade do controle negativo.

Controle negativo (alíquotas)	Média dos Ct
5	24,590
10	23,378
5	24,321
7	23,962
2	24,579
Média	24,166
DP	0,455
CV%	1,884

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas.

O baixo valor de desvio padrão dos Ct entre as alíquotas avaliadas demonstra que o processo de produção e aliquotagem do lote de controles positivos e negativos foram homogêneos.

9.3 Avaliação da estabilidade do *mix* (sondas+primers)

Para avaliar a degradação ou degeneração do *mix*, uma alíquota foi submetida a processos de descongelamento e congelamento por 18 vezes em um intervalo de 120 dias. A cada descongelamento, o *mix* foi avaliado por reações de qPCR nas quais foram analisadas os Ct dos controles positivos. Como controle, paralelamente, 18 alíquotas do *mix* foram descongeladas, utilizadas e descartadas a cada dia. Os valores de Ct para HTLV-1 e HTLV-2 obtidos foram submetidos ao cálculo da média, desvio padrão e CV. Não houveram diferenças significativas a média dos Ct dos controles e das alíquotas avaliadas. Portanto, o *mix* mostrou-se estável, sem alterações significativas durante toda a avaliação (Tabela 17).

Tabela 17. Avaliação da estabilidade do *mix* (*primers*+*sondas*).

Data do qPCR	Média dos Ct do controle (HTLV-1)	Estabilidade do <i>mix</i> (Ct HTLV-1)	Média dos Ct do controle (HTLV-2)	Estabilidade do <i>mix</i> (Ct HTLV-2)
03/12/2013	30,334	30,235	31,017	30,834
04/12/2013	30,311	30,236	30,894	30,89
09/12/2013	30,817	30,688	31,507	31,374
05/02/2014	30,106	30,13	30,629	30,7
07/02/2014	30,236	29,922	30,795	30,576
17/02/2014	29,894	30,32	30,525	30,921
18/02/2014	30,397	30,348	30,885	30,788
18/02/2014	30,157	29,985	30,686	30,743
24/02/2014	30,106	30,045	30,504	30,694
07/03/2014	30,461	30,362	30,843	31,004
10/03/2014	30,159	30,219	30,699	30,847
11/03/2014	30,082	30,058	30,58	30,655
12/03/2014	30,573	30,365	30,94	31,001
13/03/2014	30,361	30,287	30,955	30,847
14/03/2014	30,653	30,494	31,272	31,178
17/03/2014	30,28	30,154	30,845	30,929
18/03/2014	30,21	30,209	30,731	30,743
19/03/2014	30,559	30,518	31,217	31
Média	30,316	30,254	30,862	30,873
DP	0,231	0,195	0,266	0,194
CV%	0,762	0,645	0,862	0,628

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas.

9.4 Avaliação da estabilidade dos controles positivos

Com o objetivo de avaliar a degradação ou degeneração dos controles positivos, uma alíquota foi submetida a processos de descongelamento e congelamento por 17 vezes em um intervalo de 120 dias. A cada descongelamento, os controles foram avaliados por reações de qPCR, nas quais foram analisadas os Ct dos mesmos. Como controle, paralelamente, 17 alíquotas do lote 001 foram avaliadas em reações de qPCR. Os valores de Ct para HTLV-1 e HTLV-2 obtidos foram submetidos ao cálculo da media, desvio padrão e CV. Ao aplicar o teste estatístico *t* observou-se diferença significativa entre os

controles e a estabilidade das alíquotas para HTLV-1 ($p<0,001$ e controles e a estabilidade das alíquotas para HTLV-2 ($p<0,001$). Os controles mostraram-se estáveis até o sexto processo de congelamento e descongelamento devido as reações de qPCR apresentarem uma variação no *cycle threshold* dos controles positivos superior a 0,5 (Tabela 18).

Tabela 18. Avaliação da estabilidade dos controles positivos (lote 001).

Data do qPCR	Média dos Ct do controle (HTLV-1)	Estabilidade do C+ (Ct HTLV-1)	Média dos Ct do controle (HTLV-2)	Estabilidade do C+ (Ct HTLV-2)
03/12/2013	30,334	30,252	31,017	30,892
04/12/2013	30,311	30,5	30,894	31,256
09/12/2013	30,817	30,6	31,507	31,246
07/02/2014	30,106	30,295	30,629	30,891
17/02/2014	30,236	30,757	30,795	31,452
18/02/2014	29,894	30,585	30,525	31,135
18/02/2014	30,397	31,311	30,885	31,915
24/02/2014	30,157	31,56	30,686	32,304
07/03/2014	30,106	32,203	30,504	32,874
10/03/2014	30,461	32,651	30,843	33,304
11/03/2014	30,159	33,313	30,699	34,116
12/03/2014	30,082	33,063	30,58	33,722
13/03/2014	30,573	33,24	30,94	34,258
14/03/2014	30,361	33,716	30,955	34,382
17/03/2014	30,653	33,65	31,272	34,59
18/03/2014	30,28	33,501	30,845	34,048
19/03/2014	30,21	33,976	30,731	34,793
Média	30,316	32,069	30,862	32,775
DP	0,231	1,391	0,266	1,455
CV%	0,762	4,339	0,862	4,440

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; C+: controle positivo.

9.5 Avaliação da estabilidade do *master mix*

Com o objetivo de avaliar a degradação ou degeneração do *master mix*, uma alíquota foi submetida a processos de descongelamento e congelamento por 18 vezes em um intervalo de 120 dias. A cada descongelamento, o *master mix* foi avaliado por reações de qPCR, nas quais os Ct foram analisados. Como controle, paralelamente 18 alíquotas do *master mix* foram utilizadas em reações de qPCR. Os valores de Ct para HTLV-1 e HTLV-2 obtidos foram submetidos ao cálculo da média, desvio padrão e CV (Tabela 19). Não houveram diferenças significativas a média dos Ct dos controles e das alíquotas avaliadas. Portanto, o *master mix* mostrou-se estável durante o período testado.

Tabela 19. Avaliação da estabilidade do *master mix*.

Data do qPCR	Média dos Ct do controle (HTLV-1)	Estabilidade do MM (Ct HTLV-1)	Média dos Ct do controle (HTLV-2)	Estabilidade do MM (Ct HTLV-2)
03/12/2013	30,334	30,407	31,017	30,963
04/12/2013	30,311	29,854	30,894	30,325
09/12/2013	30,817	30,877	31,507	31,559
05/02/2014	30,106	30,25	30,629	30,655
07/02/2014	30,236	29,952	30,795	30,082
17/02/2014	29,894	30,511	30,525	30,91
18/02/2014	30,397	30,483	30,885	30,948
18/02/2014	30,157	30,003	30,686	30,345
24/02/2014	30,106	30,241	30,504	30,834
07/03/2014	30,461	30,338	30,843	30,968
10/03/2014	30,159	30,564	30,699	31,07
11/03/2014	30,082	30,173	30,58	30,615
12/03/2014	30,573	30,594	30,94	31,233
13/03/2014	30,361	30,49	30,955	30,994
14/03/2014	30,653	30,484	31,272	31,102
17/03/2014	30,28	30,497	30,845	30,97
18/03/2014	30,21	30,383	30,731	30,915
19/03/2014	30,559	30,573	31,217	31,17
Média	30,316	30,370	30,862	30,869
DP	0,231	0,255	0,266	0,355
CV%	0,762	0,841	0,862	1,152

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; Ct: *cycle threshold*; HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; MM: *master mix*.

10. Processo de Validação aplicado a testes diagnósticos

10.1 Precisão

A precisão da plataforma em desenvolvimento foi avaliada por meio dos ensaios de repetibilidade (intra-ensaio) e reprodutibilidade (inter-ensaio). Assim, três diluições dos controles positivos foram utilizadas nas reações (10^5 , 10^4 , 10^3 cópias virais/reacção). Para o ensaio de repetibilidade, três corridas de qPCR foram realizadas no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador.

O ensaio de reprodutibilidade foi realizado a partir de três diluições dos controles positivos para HTLV-1 (10^5 , 10^4 , 10^3 cópias virais/reação), as quais foram utilizadas em três corridas de qPCR realizadas em dias alternados, utilizando diferentes lotes de reagentes e preparadas por três operadores distintos. As reações de qPCR foram realizadas com cinco réplicas de cada diluição. A partir dos resultados de Ct, foram calculados a média, desvio padrão e CV para HTLV-1e HTLV-2 (Tabela 20 e 21).

Tabela 20. Intra-ensaio para HTLV-1 e HTLV-2

Tabela 2 - Média Cq para HTLV-1 e HTLV-2					
Diluição		HTLV-1		HTLV-2	
		Média dos Ct	CV%	Média dos Ct	CV%
Corrida 1	10 ⁵	24,496	0,113	24,179	0,181
	10 ⁴	27,847	0,150	27,593	0,331
	10 ³	31,076	0,131	30,970	0,370
Corrida 2	10 ⁵	24,445	0,254	24,129	0,219
	10 ⁴	27,791	0,137	27,539	0,192
	10 ³	31,008	0,225	30,887	0,240
Corrida 3	10 ⁵	24,428	0,157	24,172	0,177
	10 ⁴	27,687	0,181	27,538	0,343
	10 ³	30,969	0,033	30,942	0,408

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; Ct: *cycle threshold*; CV: coeficiente de variação

Tabela 21. Inter-ensaio para HTLV-1 e HTLV-2.

diluição	HTLV-1		HTLV-2	
	Média dos Ct	CV (%)	Média dos Ct	CV (%)
10^5	24,404	0,643	24,176	0,475
10^4	27,722	0,553	27,593	0,340
10^3	31,020	0,478	30,996	0,408

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; Ct: *cycle threshold*; CV: coeficiente de variação.

Os coeficientes de variação (CV) dos testes não ultrapassaram 0,653%, resultado dentro do limite proposto pelo *National Virus Reference Laboratory*, Irlanda (Moens *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2011).

10.2 Robustez

Com o intuito de avaliar o potencial de contaminação cruzada por *carry-over* foi aplicada a técnica da “mesa de xadrez” (Figura 23), na qual em uma placa foram pipetadas amostras positivas para HTLV-1 lado a lado com amostras sem alvo (branco de reação). Nenhum branco de reação apresentou curva de amplificação, indicando que não houve contaminação cruzada durante o preparo das reações.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
C	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
D	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
F	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
H	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

Figura 23. Esquema da montagem da placa de reação para o ensaio de robustez. Amostras positivas para HTLV-1 foram pipetadas lado a lado com amostras sem alvo por toda a placa em forma de “mesa de xadrez”.

10.3 Sensibilidade analítica

Com o objetivo de avaliar o limite de detecção mínima do teste, sete níveis de diluições seriadas, de razão dois, (controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2) foram testados, variando de 62,5 a 0,975 cópias virais/reação. Todas as reações foram realizadas no formato *multiplex*, em oito réplicas de cada diluição. Dois testes foram realizados em dias distintos utilizando lotes diferentes de *primers* e sondas, pipetados por três diferentes operadores (Tabela 22 e 23). A sensibilidade analítica (lote 01) obtida pela média entre os operadores foi 4,64 cópias/reação para HTLV-1 (variando de 3,83 a 5,54 cópias/reação) e 10,77 cópias/reação para HTLV-2 (variando de 7,02 a 17,21 cópias/reação). A sensibilidade analítica (lote 02) foi 3,06 cópias/reação para HTLV-1 (variando de 2,81 a 3,55 cópias/reação) e 10,99 cópias/reação para HTLV-2 (variando

de 8,62 a 13,53 cópias/reação). A média de detecção entre os experimentos foi 3,85 cópias/reação para HTLV-1 (variando de 2,81 a 5,54 cópias/reação) e 10,88 cópias/reação para HTLV-2 (variado de 7,02 a 17,21 cópias/reação).

Tabela 22. Avaliação da Sensibilidade analítica para HTLV-1 e HTLV-2 (lote 01) utilizando o método de regressão linear Probit (IC 95%).

Cópias/reação	nº de réplicas detectadas			Limite de detecção (IC 95%)
	OP 01	OP 02	OP 03	
HTLV-1				
62,5	8/8	8/8	8/8	4,64 (3,83 - 5,54)
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	8/8	8/8	8/8	
7,81	8/8	8/8	8/8	
3,9	7/8	8/8	7/8	
1,95	4/8	3/8	6/8	
0,975	5/8	3/8	3/8	
HTLV-2				
62,5	8/8	8/8	8/8	10,77 (7,02 - 17,21)
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	8/8	7/8	8/8	
7,81	8/8	5/8	7/8	
3,9	5/8	6/8	7/8	
1,95	3/8	3/8	3/8	
0,975	3/8	0/8	2/8	

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; nº: número; OP: operador; IC: intervalo de confiança.

Tabela 23. Avaliação da Sensibilidade analítica para HTLV-1 e HTLV-2 (lote 02) utilizando o método de regressão linear Probit (IC de 95%)

Cópias/reação	nº de réplicas detectadas			Limite de detecção (IC 95%)
	OP 01	OP 02	OP 03	
HTLV-1				
62,5	8/8	8/8	8/8	3,06 (2,81 - 3,55)
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	8/8	8/8	8/8	
7,81	8/8	8/8	8/8	
3,9	7/8	8/8	8/8	
1,95	6/8	5/8	4/8	
0,975	1/8	1/8	3/8	
HTLV-2				
62,5	8/8	8/8	8/8	10,99 (8,62 - 13,53)
31,25	8/8	8/8	8/8	
15,625	7/8	8/8	8/8	
7,81	8/8	7/8	6/8	
3,9	5/8	6/8	6/8	
1,95	1/8	2/8	2/8	
0,975	1/8	2/8	1/8	

HTLV: vírus linfotrópico de células T humanas; nº: número; OP: operador; IC intervalo de confiança.

10.4 Especificidade analítica

A fim de verificar possíveis reações cruzadas das sondas e *primers* utilizados no desenvolvimento dessa plataforma, foi realizado o ensaio de especificidade analítica. Os conjuntos de *primers* e sondas TaqMan® com alvo na região viral *pol* do HTLV-1, HTLV-2 e controle interno (IC) foram testados *in vitro*, a partir de ácidos nucleicos extraídos de um painel adquirido do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) que contempla os vírus HAV, HBV, HCV, HIV e B19. Ainda, 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite B (HBV) e 30 amostras de pacientes portadores do vírus da Hepatite C (HCV) também foram analisadas em reações de qPCR. A avaliação *in silico* foi realizada por meio da comparação das sequências de sonda e *primers* com o banco de

dados público BLAST, para a verificação de homologia com outros microrganismos. As reações não apresentaram reatividade cruzada com os tipos virais testados e as sequências de *primers* e sondas apresentaram 100% de similaridade com HTLV e beta globina (CI), portanto adequados para o ensaio.

10.5 Sensibilidade diagnóstica

Para avaliar este parâmetro, 278 amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1 e 42 amostras de pacientes infectados pelo HTLV-2 foram testadas. O teste, executado no formato *multiplex*, apresentou de 94,6% de sensibilidade para HTLV-1, e 78,6% para HTLV-2. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

10.6 Especificidade diagnóstica

O conjunto de *primers* e sondas foram submetidos ao teste de especificidade diagnóstica. Para tanto, 288 amostras não reagentes para sorologia para HTLV-1/2 foram submetidas à reação de qPCR no formato *multiplex*. Não foi observado amplificação das amostras, exibindo 100% de especificidade diagnóstica. Todas as reações foram realizadas em duplicata.

11. Resolução de casos sem definição de tipo viral e indeterminados no teste de *Western Blot* (WB)

O teste de *Western Blot* em alguns casos não permite discriminar a infecção pelo HTLV-1 do HTLV-2. Ainda, existem ocasiões em que o padrão de bandas não define o *status* de infecção, permanecendo com resultado indeterminado. Um total de 11 amostras avaliadas pelo WB permaneceram sem definição do tipo viral e 14 amostras mostraram-se indeterminadas. A plataforma desenvolvida, foi capaz de definir o tipo viral em 10 de 11 amostras não tipadas e concluir o estado de infecção em seis, de 14 amostras avaliadas (Tabela 24).

Tabela 24. Amostras que apresentaram padrão indeterminado e não tipadas no método de WB avaliadas pela plataforma de PCR em tempo real desenvolvida.

<i>Western Blot</i>		Plataforma qPCR	
<i>Classificação</i>	n° de amostras	HTLV-1	HTLV-2
Indeterminadas	14	4	2
Não tipadas	11	10	0

qPCR: PCR em tempo real; HTLV: vírus linfotrópico de células T humana.

Uma amostra apresentou um padrão de bandas referente à dupla infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, a qual foi corretamente identificada pelo teste de qPCR desenvolvido.

Discussão

V. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou o desenvolvimento, a padronização e a validação de uma plataforma molecular utilizando a metodologia da PCR em tempo real (NAT) no formato *multiplex* para o diagnóstico confirmatório e discriminatório da infecção pelo HTLV-1/2. Desde o início da implementação dos testes de triagem para o HTLV-1/2, em meados dos anos 80, dificuldades referentes à identificação dos indivíduos verdadeiramente acometidos por esta infecção tem sido um obstáculo até os dias de hoje. No Brasil, a identificação dos indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 é feita principalmente por meio da triagem sorológica para candidatos a doação de sangue, compulsória desde 1993 (Portaria nº 1.376 - 19/11/1993, Ministério da Saúde). O algoritmo brasileiro para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2 adotado em bancos de sangue, preconiza a realização de um teste de triagem imunoenzimático (EIA), seguido da confirmação dos resultados positivos pela metodologia de *Western Blot* (WB). No entanto, devido ao alto custo associado ao elevado índice de resultados indeterminados, a confirmação é facultativa. Como uma alternativa ao teste de WB, os métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR em tempo real (qPCR), tem sido propostos por diversos autores (Estes e Sevall, 2003; Besson e Kazanji, 2009; Andrade *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011). Embora esses métodos sejam altamente específicos e sensíveis, a ausência de adequada padronização e validação, inviabiliza sua implementação na rotina diagnóstica confirmatória.

1. Padronização da extração de DNA

Os métodos *in house* de PCR em tempo real (qPCR) para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2 descritos, utilizam fontes distintas para a extração de DNA. Rosadas *et al.* (2013) utilizaram células mononucleares de sangue periférico (PBMC) para obtenção de DNA. Diferentemente, Waters e colaboradores selecionaram o sangue total como fonte para extração de DNA. O HTLV-1/2 infecta as células mononucleares, assim, a probabilidade de encontrar células infectadas em PBMC seria maior, quando comparado ao sangue total, o que poderia refletir na sensibilidade do teste. Por outro lado, a separação dessas células envolve múltiplas etapas, agregando custo e elevando o tempo do procedimento. Neste estudo, optou-se por utilizar o sangue total para a extração de

DNA em detrimento da extração de PBMC, devido a facilidade, rapidez, custo e potencial de automação. Além disso, a extração de DNA foi padronizada a partir do sangue total e *buffy coat*, utilizando três *kits* de extração de diferentes fabricantes (A, B e C), a fim de comparar os rendimentos, pureza e reprodutibilidade dos mesmos. A extração de DNA, a partir do *buffy coat*, apesar de apresentar melhor rendimento, apresenta maior variação nas concentrações entre as amostras testadas, indicando que essa fonte apresenta baixa reprodutibilidade. Portanto, foi considerada uma fonte inadequada para obtenção do DNA. Em contraste, a extração a partir do sangue total, apesar de apresentar menor rendimento, mostrou baixa variação nas concentrações de DNA. De acordo com as concentrações avaliadas, o *kit* de extração do fabricante A apresentou melhor rendimento, no entanto, o *kit* de extração B foi eleito e indicado para a extração, devido seu elevado rendimento, menor variação entre as concentrações e melhor pureza do DNA.

A concentração e pureza de DNA são elementos fundamentais e podem também impactar diretamente na sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos baseados na qPCR. O excesso de DNA pode promover amplificações inespecíficas, podendo gerar resultados falso positivos. Por outro lado, a falta de DNA e a contaminação da amostra com solventes orgânicos e/ou proteínas pode acarretar a inibição da PCR e consequentemente, levar a resultados falso negativos.

2. Região gênica para desenho de *primers* e sondas e metodologias de detecção

O genoma do HTLV-1/2 é composto pelos genes estruturais *gag*, *pro*, *pol* e *env*, e pelos genes regulatórios *tax* e *rex*, bem como outros genes acessórios (Seiki *et al.*, 1983; Gaudray *et al.*, 2002; Matsuoka e Jeang, 2007). Os genes *pol*, *env* e *tax*, são conservados entre o HTLV-1 e HTLV-2 e, por este motivo são comumente utilizados como alvo das reações de PCR e qPCR nas metodologias diagnósticas descritas (Mangano *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2011; Naderi *et al.*, 2012). No entanto, estes protocolos não apresentam um consenso, tampouco uma padronização de qual seria a região gênica ideal para a proposição de *primers* e sondas para reações de PCR e qPCR. Desta forma, diferentes sensibilidades e especificidades são descritas de acordo com a região gênica adotada. Mangano *et al.* (2004) em um estudo com doadores de sangue, empregando a técnica de *nested* PCR com alvo nos genes *pol*, *env* e *tax*, encontraram divergências em seus resultados. Uma das amostras avaliadas por esse grupo, apresentou positividade para as

três regiões pesquisadas (HTLV-1), outra, para as regiões *pol* e *tax* (HTLV-2) e três amostras positivas somente para o gene *tax* (HTLV). Um outro trabalho, também relatou resultados discordantes ao comparar a sensibilidade das reações de PCR para os genes *tax* e *pol* (Soldan *et al.*, 1999). As diferenças das sensibilidades observadas nesses estudos podem decorrer de provírus defectivos, os quais não possuem todas as regiões gênicas integradas ao genoma do hospedeiro, mutações nos sítios de ligação de *primers*, ou ainda, os *primers utilizados* não foram capazes de detectar alguns subtipos do HTLV-1/2 (Soldan *et al.*, 1999; Takenouchi *et al.*, 2011).

No presente estudo, foi realizado um alinhamento múltiplo com todas os genomas completos do HTLV-1/2 depositados no *GenBank*, com objetivo de escolher uma região conservada, porém distinta entre cada um dos tipos virais. A região gênica viral *pol* foi eleita como alvo das sondas e *primers* das reações de qPCR para HTLV-1 e HTLV-2. Outros genes, como *tax* e *env*, foram testados, no entanto, ao avaliar a especificidade, foi observado um elevada taxa de reações de qPCR falso positivas, possivelmente devido à reatividade cruzada (gene *tax*) e a baixa sensibilidade para a detecção do HTLV-1 e HTLV-2 (gene *env*) (dados não mostrados).

A ausência de padronização não está restrita apenas às regiões gênicas adotadas para o desenho de sondas e *primers*, mas também estende-se à metodologia de detecção utilizadas nas reações de PCR e qPCR para o diagnóstico molecular do HTLV-1/2. Muitas são as metodologias de detecção descritas para a tecnologia da qPCR, no entanto, dentre estas, podemos destacar o sistema TaqMan® (sondas de hidrólise), *molecular beacons* (sondas) e a metodologia de SYBR® (intercalantes de DNA). A diferença entre essa metodologias está relacionada principalmente a sensibilidade, especificidade e custo de cada uma delas.

O sistema TaqMan®, caracterizado pela presença da sonda marcada com fluoróforos, é mais sensível e específica, no entanto, apresenta maior custo quando comparado com a metodologia SYBR®. As *molecular beacons*, compostas também por sondas fluorescentes, são mais estáveis que as sondas TaqMan®, devido a sua conformação em formato de grampo, entretanto, é o metodologia que apresenta maior custo entre as três. O sistema de sondas (TaqMan® e *molecular beacons*) permite, a detecção de mais de um alvo em uma única reação (*multiplex*), dada a possibilidade da marcação das sondas com diferentes fluorocromos. Assim, diversos autores descreveram protocolos baseados nessas metodologias de detecção (Dehee *et al.*, 2002; Adai *et al.*, 2006; Besson e

Kazanji, 2009). Nagai e colaboradores (1998), utilizando a metodologia TaqMan®, descreveram um protocolo de qPCR para a detecção e quantificação da carga proviral de indivíduos infectados exclusivamente pelo HTLV-1. Outros dois trabalhos, um utilizando a metodologia TaqMan® e o outro *molecular beacons*, descreveram protocolos capazes de detectar e discriminar, em uma única reação *multiplex* de qPCR, o HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3 (Besson e Kazanji, 2009; Moens *et al.*, 2009). Alternativamente, devido ao baixo custo e não utilização de sondas, Bruna C. Arruda (2008) adotaram a metodologia SYBR® no ensaio *in house* desenvolvido para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1. A plataforma diagnóstica desenvolvida neste trabalho foi baseada na metodologia TaqMan® no formato *multiplex*. Esta metodologia é baseada em sondas marcadas, portanto, altamente sensível e específica que permite a detecção de mais de um alvo em uma única reação (*multiplex*). Para tanto, dois conjuntos de *primers* e sondas específicas para cada tipo viral foram desenhadas e marcadas com fluorocromos distintos, possibilitando a detecção e discriminação do HTLV-1 e HTLV-2.

As patologias relacionadas à infecção por este retrovírus estão principalmente associadas ao HTLV do tipo 1 (Mahieux e Gessain, 2003; Feuer e Green, 2005). Assim, é de extrema importância que um método diagnóstico seja capaz de discriminar a infecção dos tipos 1 e 2 do HTLV. Essa distinção é essencial para o tratamento e aconselhamento dos indivíduos infectados. Portanto, o formato das reações de qPCR adotado neste estudo permitiu a detecção e discriminação da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, em uma única reação, reduzindo o custo e o tempo de realização do diagnóstico.

A escolha da região gênica, bem como a metodologia de detecção, está diretamente relacionada à sensibilidade, e a especificidade de um teste de amplificação de ácidos nucleicos. Assim, a padronização de uma região gênica e metodologia de detecção, para o diagnóstico do HTLV-1/2, permitirá a comparação de resultados obtidos entre diferentes centros, minimizando a variabilidade na sensibilidade e especificidade do teste permitindo a conclusão segura do diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2.

3. Validação

Um dos maiores obstáculos para a implementação de um método diagnóstico molecular, baseado na tecnologia NAT, é a deficiência no processo de validação nos testes *in house* desenvolvidos até o momento, associada à inexistência de um teste

comercial. Essas falhas vão desde o número mínimo de amostras utilizados para a determinação da sensibilidade diagnóstica até avaliação de estabilidade e homogeneidade de controles e reagentes.

Este é o primeiro estudo no qual foi desenvolvido, otimizado e validado uma mistura única contendo todos os *primers* e sondas (*mix*) utilizados para o diagnóstico do HTLV-1/2. Vários fornecedores de *primers* e sondas foram avaliados e validados. A avaliação da homogeneidade tem por objetivo avaliar falhas na distribuição do *mix* de *primers* e sondas e garantir que todas as alíquotas produzidas contenham a mesma concentração desses. Esse parâmetro foi avaliado por meio da escolha aleatória de alíquotas do *mix* e testagem em reações de qPCR. Assim, baseado no baixo desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos *cycle threshold* (Ct), foi demonstrado que o processo de envase do *mix* foi homogêneo. O *mix* também foi submetido ao processo de congelamento e descongelamento em um período de 120 dias para avaliar a estabilidade dos compostos. Após análise do desvio padrão e CV dos Ct, foi demonstrado que o *mix* permaneceu estável durante todo o período avaliado. Apesar da estabilidade apresentada pelo *mix*, a avaliação deve ser realizada continuamente, por um longo período, a fim de se determinar o tempo máximo em que o mesmo permanece sem apresentar degradação.

Além da produção e validação do *mix*, foi produzido e validado pela primeira vez, um lote de controle negativo e controles positivos para HTLV-1 e HTLV-2. O lote de controles positivos foi desenvolvido a partir do DNA das linhagens celulares MT-2 (HTLV-1) e Gu (HTLV-2), de maneira a produzir um controle único para os dois tipos virais. O lote de controles positivos foi também avaliado quanto a homogeneidade e estabilidade. A homogeneidade foi realizada da mesma maneira que para o *mix* e, por meio da análise do desvio padrão e CV dos Ct, o lote de controles positivos mostraram-se homogêneos. A análise da estabilidade demonstrou que o lote dos mesmos foi estável até sexto processo de congelamento e descongelamento, o que corrobora que processos repetidos de congelamento e descongelamento promove a degradação do DNA. O controle negativo foi submetido somente ao teste de homogeneidade e, baseado no desvio padrão e CV dos Ct, o mesmo demonstrou-se homogêneo.

Além da validação da homogeneidade e estabilidade dos reagentes e controles, é necessária a validação dos parâmetros analíticos e diagnósticos dos testes, que garantam a sua acurácia e reprodutibilidade, a fim de fornecer resultados consistentes e confiáveis. A sensibilidade diagnóstica refere-se a capacidade do teste em reconhecer os

verdadeiros positivos em relação ao total de doentes. Por outro lado, a especificidade diagnóstica caracteriza-se pela capacidade do teste em não detectar como positivo os indivíduos sadios, ou seja, excluir o estado de doença quando a mesma é ausente. Rosadas *et al.* (2013) desenvolveram uma plataforma quantitativa utilizando a metodologia TaqMan® qPCR, no formato *singleplex* para a detecção e quantificação do HTLV-1. Esta plataforma foi capaz de detectar 27 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1, apresentando 100% de sensibilidade diagnóstica. Ainda, 23 amostras negativas não apresentaram amplificação, revelando 100% especificidade analítica. Um outro estudo, qualitativo, desenvolvido para detectar o HTLV-1 e HTLV-2 em reações independentes, avaliou 169 amostras positivas para HTLV-1 e quatro amostras positivas para HTLV-2. A sensibilidade e especificidade do teste foi 99,4% e 98,5%, respectivamente (Andrade *et al.*, 2010). Utilizando a metodologia de SYBR® para o diagnóstico do HTLV-1, Bruna C. Arruda (2008) atingiram a sensibilidade e especificidade de 87,9% e 100% respectivamente.

Além dos ensaios capazes de detectar somente um tipo viral por reação (*singleplex*), Estes e Sevall (2003) desenvolveram uma plataforma *multiplex* capaz de detectar e quantificar o HTLV-1 ou HTLV-2 simultaneamente (*biplex*). Os autores obtiveram a sensibilidade de 87,5 para HTLV-1, 81,2% para HTLV-2 e 100% de especificidade ao avaliar amostras artificialmente infectadas com HTLV-1 e HTLV-2, por meio da adição de uma quantidade conhecida de cópias virais em amostras de sangue total. Em outro ensaio *multiplex*, capaz de detectar o HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3 simultaneamente (*triplex*), avaliou-se 135 amostras positivas para HTLV-1, quatro para HTLV-2 e duas HTLV-3. Para HTLV-1, 131 amostras mostraram-se positivas (97% sensibilidade), as quatro amostras HTLV-2 e as duas HTLV-3 apresentaram positividade neste teste (100% sensibilidade). Não foram avaliadas amostras negativas nesse estudo, impossibilitando o cálculo da especificidade (Moens *et al.*, 2009). Waters *et al.* (2011), em um ensaio *multiplex* qualitativo e quantitativo capaz de detectar o HTLV-1 e HTLV-2, avaliaram cinco amostras positivas para HTLV-1 e 21 amostras positivas para HTLV-2 (baseado na reatividade do WB). As cinco amostras HTLV-1 positivas e 13 HTLV-2 foram detectadas, atingindo 100% e 61,9% de sensibilidade para HTLV-1 e HTLV-2 respectivamente. A maioria dos trabalhos descritos utilizam um restrito número de amostras, tanto infectadas quanto obtidas de indivíduos saudáveis, o que pode

subestimar ou superestimar a sensibilidade e especificidade encontrada por estas metodologias.

Ao considerarmos uma sensibilidade de no mínimo 90%, um tamanho amostral de no mínimo 267 indivíduos infectados deve ser avaliado para estimar essa medida, com um erro relativo (ϵ) de 4% e um intervalo de confiança de 95%, de acordo com a expressão:

$$n = \frac{1,96^2(1 - \theta)}{\epsilon^2\theta},$$

no qual 1,96 é obtido da tabela de distribuição normal padrão e θ é a sensibilidade do método diagnóstico. Analogamente, também considerando uma especificidade de no mínimo 90%, um tamanho amostral de 267 indivíduos sem a infecção é suficiente para estimar esta medida, com um erro relativo (ϵ) de 4% e intervalo de confiança de 95%. Na plataforma desenvolvida neste estudo, foi avaliado um total de 278 amostras positivas para HTLV-1, 42 para HTLV-2 e três amostras com a presença dos dois tipos virais. A sensibilidade diagnóstica para HTLV-1 foi de 94,6%, enquanto para HTLV-2 foi 78,6%. Das três amostras consideradas positivas para os dois tipos virais, esta plataforma foi capaz de identificar a dupla infecção em apenas uma amostra. Entretanto, as outras duas amostras foram identificadas como HTLV-1. Ainda, 288 amostras de indivíduos com sorologia não reagente para o HTLV-1/2 mostraram-se negativas nesta plataforma, atingindo 100% de especificidade diagnóstica. Ocasionalmente, algumas amostras negativas testadas apresentaram amplificação tardia ($Ct > 40$). Dessa forma, a fim de garantir a ausência de resultados falso positivos, convencionou-se como resultado negativo, amplificações superiores ao Ct 40. Do ponto de vista estatístico, essa foi a primeira plataforma *multiplex* de qPCR qualitativa para o diagnóstico do HTLV-1/2 a utilizar um número adequado de amostras HTLV-1 positivas e negativas para os cálculos da sensibilidade e especificidade diagnóstica. Contudo, um número maior de amostras positivas para HTLV-2 devem ser analisadas para que a sensibilidade seja determinada no mesmo intervalo de confiança.

A sensibilidade observada para o HTLV-2 foi inferior quando comparada ao HTLV-1. Diversas causas podem explicar este achado: i) o espaço amostral reduzido de espécimes infectadas pelo HTLV-2 ($n = 42$), o que não reflete adequadamente a sensibilidade obtida; ii) pouco se conhece sobre a carga proviral do HTLV-2, mas em

geral, é caracterizada por baixos níveis quando comparadas a carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1, o que pode levar a resultados falso negativos; iii) O HTLV-2 pode apresentar divergências genéticas não cobertas pelos *primers* e sondas utilizados por esta plataforma; iv) a sensibilidade analítica para HTLV-2 foi menor quando comparada ao HTLV-1 (3,85 cópias/reação para HTLV-1 e 10,88 cópias/reação para HTLV-2).

Alguns trabalhos relatam a dificuldade em diagnosticar o HTLV-2 pela metodologia de qPCR em pacientes co-infectados pelo HIV. Isto se deve ao estado de imunossupressão e à terapia anti-retroviral que os mesmos são submetidos (afetando os níveis de transcrição reversa viral) (Zehender *et al.*, 1997; Montanheiro *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011). No nosso estudo, dos 16 pacientes infectados pelo HTLV-2 (Instituto Emílio Ribas), oito apresentavam co-infecção pelo HIV e desses, somente um mostrou-se negativo na plataforma desenvolvida. Portanto, não encontramos relação entre resultados falso negativos e a co-infecção pelo HIV, apesar do número restrito de amostras avaliadas.

A plataforma *multiplex* de qPCR desenvolvida neste trabalho, foi capaz de detectar e discriminar a infecção do HTLV-1 e HTLV-2. Além disso, a presença de um par de *primers* e uma sonda para o gene da beta-globina, permitiu o uso deste gene como controle interno de amplificação (CI). O CI é co-amplificado nas reações de qPCR com os alvos (HTLV-1 e HTLV-2) com o objetivo de garantir a ausência de falhas nos procedimentos pré-analíticos e analíticos e, portanto, tem a função de validar os resultados negativos. O Comitê de Padronização Europeu juntamente com a Organização de Padrões Internacional (*International Organization for Standardization*, ISO) propuseram um guia de diagnósticos moleculares, o qual preconiza a utilização do CI em testes utilizando a metodologia da PCR. Outros trabalhos também incluíram em suas plataformas *multiplex* o CI nas reações de qPCR (Besson e Kazanji, 2009; Waters *et al.*, 2011).

Em relação aos parâmetros analíticos do teste molecular, podemos destacar a sensibilidade analítica e diagnóstica, precisão e robustez. A sensibilidade analítica ou limite de detecção (LoD) refere-se a capacidade do teste em detectar concentrações baixas de uma substância em uma amostra biológica. Diversos autores avaliam a sensibilidade analítica de forma equivocada, por meio de diluições seriadas, definindo o LoD como a menor diluição detectada, ou ainda, analisando somente uma dada

concentração (Tamegao-Lopes *et al.*, 2006; Besson e Kazanji, 2009; Moens *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2011). Assim, o LoD encontrado por Moens *et al.* (2009) foi 10 cópias/reação de do HTLV-1 e HTLV-2. De forma semelhante, a plataforma desenvolvida por Rosadas *et al.* (2013) foi capaz de detectar uma cópia/reação do HTLV-1.

A avaliação do LoD deve ser realizada por meio da regressão linear (Probit) e calculado em um intervalo de confiança de 95%, além de ser avaliada a cada mudança de lote de reagentes (Burd, 2010). Desta forma, o ensaio de sensibilidade analítica da plataforma de qPCR desenvolvida neste trabalho foi realizada com lotes de reagentes distintos (*primers*, sondas e *master mix*) e avaliados por regressão linear (Probit, IC 95%). A média do LoD entre os experimentos foi 3,85 cópias/reação para HTLV-1 (2,81 a 5,54 cópias/reação) e 10,88 cópias/reação para HTLV-2 (7,02 a 17,21 cópias/reação).

A especificidade analítica avalia a capacidade do teste em detectar somente a substância/organismo alvo na amostra clínica (reação cruzada). Para descartar o potencial de reações cruzadas em diagnósticos moleculares, devem ser testados principalmente organismos com estrutura genética semelhante. Além da avaliação *in vitro*, deve ser realizada uma avaliação *in silico* por meio da comparação das sequências dos *primers* e sondas com sequências de banco de dados públicos disponíveis, por exemplo *GenBank* (ferramenta BLAST), a fim de verificar as similaridades com outros organismos (Burd, 2010). A avaliação *in silico* revelou 100% de similaridade para os alvos analisados nesta plataforma (HTLV-1, HTLV-2 e beta-globina).

Não existe um número mínimo de amostras preconizado para ser analisado nos ensaios *in vitro*, no entanto, este estudo avaliou em reações de qPCR os vírus HAV, HBV, HCV, HIV-1, HIV-2 e B19 com painéis adquiridos do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC). Além do painel testado, 30 amostras de indivíduos infectados pelo HIV, 30 amostras de indivíduos infectados pelo HBV e 30 amostras de indivíduos infectados pelo HCV foram avaliadas nas reações de qPCR. A plataforma desenvolvida não apresentou reatividade cruzada com as espécimes avaliadas, tornando-se pioneira na avaliação deste parâmetro (*in vitro*).

A precisão de um ensaio é definida como o grau de variação entre resultados obtidos sob condições experimentais previamente estipuladas, a fim de verificar a presença de erros aleatórios causadas por fatores que variam entre os experimentos. Este parâmetro é normalmente avaliado por meio da repetibilidade (intra-ensaio), a qual avalia a imprecisão dentro de uma corrida de qPCR e reprodutibilidade (inter-ensaio), que

refere-se a imprecisão em diferentes corridas de qPCR em diferentes dias (Burd, 2010). Rosadas *et al.* (2013) avaliaram a repetibilidade da plataforma desenvolvida por meio da avaliação de diluições seriadas de um controle positivo para HTLV-1 (50.000 a 5 cópias/reação) em triplicata em um mesmo dia. A reprodutibilidade foi avaliada por meio de 15 réplicas de uma diluição do controle positivo (HTLV-1) em dois dias alternados. Os coeficientes de variação (CV) dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade permaneceram dentro dos limites postulados pelo *National Virus Reference Laboratory*, Irlanda. Outros trabalhos avaliaram a precisão das plataformas de qPCR (*multiplex* ou *singleplex*) de maneira semelhante, nos quais os CV também permaneceram dentro dos valores limites. Segundo a CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), os ensaios de precisão devem ser realizados pelo menos em três níveis distintos de diluições de controles (alta, média e baixa). Ainda, no ensaio de reprodutibilidade, variáveis como operadores e lotes de reagentes devem ser avaliados. Na plataforma *multiplex* desenvolvida neste trabalho, a repetibilidade foi realizada com três níveis de controle positivo para HTLV-1 e HTLV-2 (10^5 , 10^3 e 10^3 cópias/reação), em cinco réplicas de cada diluição em três corridas em um único dia. A reprodutibilidade foi realizada com as mesmas diluições dos controles, em cinco réplicas, em três corridas realizadas em dias alternados, preparadas por três distintos operadores. O CV do ensaio de repetibilidade variou de 0,033% a 0,254% para HTLV-1 e 0,177% a 0,408% para HTLV-2, enquanto o CV para reprodutibilidade variou de 0,478% a 0,643% para HTLV-1 e 0,340% a 0,475% para HTLV-2. Esses valores estão dentro dos limites previamente estipulados (Estes e Sevall, 2003; Moens *et al.*, 2009; Waters *et al.*, 2011). Os baixos CV obtidos neste ensaio refletem a precisão do teste desenvolvido.

A robustez mensura o potencial de contaminação de uma amostra negativa por uma amostra positiva (*carryover*) durante a preparação das placas de reações de qPCR, que poderia levar a resultados falso positivos. Desta forma, este foi o primeiro teste molecular de qPCR para HTLV-1/2 que avaliou este parâmetro, tanto para reações pipetadas manualmente, quanto as pipetadas por uma estação automatizada de pipetagem (*liquid handling*). Não houve contaminação das amostras negativas durante o processo de manipulação e pipetagem das amostras.

4. Resolução do *status* da infecção

O teste de *Western Blot* (WB), preconizado como método confirmatório e discriminatório para os resultados positivos resultantes da triagem sorológica, comumente não são capazes de determinar o tipo viral ou mesmo confirmar o *status* de infecção. Um resultado indeterminado de WB pode representar: infecção verdadeira, início de soro-conversão ou resultado falso positivo (Thorstensson *et al.*, 2002). As plataformas de qPCR, por apresentar elevada sensibilidade e especificidade, são utilizadas para solucionar casos de WB indeterminados ou não tipados (Liu *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2011). Neste trabalho, com a utilização da *multiplex* qPCR, foi possível identificar o tipo viral em 10 amostras de 11 não tipadas pelo WB. Ainda, seis de 14 amostras que apresentavam perfil indeterminado no WB, foram identificadas por esta plataforma.

5. Aplicabilidade

A ocorrência da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 foi demonstrada no Brasil por volta de 1985 por diversos pesquisadores. Somente em 1993, foi preconizado pelo Ministério da Saúde a obrigatoriedade da avaliação sorológica em candidatos à doação de sangue, com o objetivo de reduzir a disseminação desta retrovirose no país. O diagnóstico do HTLV-1/2 é realizado por meio de testes de triagem sorológica que detectam anticorpos para o HTLV-1 e HTLV-2 com sensibilidade e especificidade aceitáveis, porém resultados falso-positivos podem ocorrer. A dificuldade no diagnóstico da infecção, a inexistência de uma vacina associada à deficiência do tratamento que promova cura ou controle das doenças associadas ao HTLV-1, torna o diagnóstico e intervenções a única maneira de frear a disseminação desta retrovirose. Estes fatos e a diferente morbidade do HTLV-1 em relação ao HTLV-2 tornam imperiosa a inclusão de testes complementares, chamados de confirmatórios, para a confirmação da infecção e para a discriminação entre infecção pelo HTLV-1 ou pelo HTLV-2.

A complexidade do diagnóstico é agravada no Brasil, pois não há um algoritmo diagnóstico que permita a conclusão sobre o *status* infeccioso do indivíduo. A ausência deste algoritmo exige os laboratórios e bancos de sangue de realizar os testes confirmatórios, em geral caros, e desta forma impedindo que o a população tenha acesso

ao diagnóstico da infecção pelo HTLV. O teste sorológico de *Western Blot* (WB) é usualmente utilizado para confirmar a infecção causada pelo HTLV-1/2. Apesar de útil, estes ensaios geram resultados indeterminados e em alguns casos não é possível a discriminação do tipo viral causador da infecção.

Uma alternativa ao teste confirmatório sorológico são os testes moleculares (NAT). Atualmente, não há um NAT confirmatório para HTLV disponível comercialmente. Este fato levou vários centros de pesquisa a desenvolverem seus próprios ensaios moleculares, genericamente chamados de testes *in house*. No entanto, é amplamente conhecida a dificuldade de controlar a qualidade dos testes *in house*, sobretudo quando cada laboratório utiliza diferentes metodologias NAT, diferentes alvos moleculares no genoma do HTLV, diferentes métodos de detecção, bem como inadequados e/ou incompletos processos de validação. Assim, o desenvolvimento de nossa plataforma NAT implicará no fortalecimento das instituições públicas responsáveis pelo atendimento a este agravo de saúde, além de permitir a definição de um algoritmo diagnóstico nacional para o HTLV-1/2. Indivíduos com testes de triagem positivo poderão confirmar este resultado, propiciando desta forma uma melhor qualidade e principalmente a expansão do acesso ao diagnóstico do indivíduo infectado pelo HTLV. Ainda, a inclusão deste teste na triagem pré-natal, possibilitará não só o diagnóstico, mas também ações que visem à prevenção da transmissão vertical e sexual do HTLV, somado ao pronto encaminhamento e assistência do indivíduo infectado ou com doença associada ao HTLV aos centros especializados.

A plataforma desenvolvida e validada neste trabalho, apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade, não foi capaz de detectar 100% dos casos positivos. Desta forma, a plataforma aqui proposta, deve ser utilizada como complemento ao teste de WB, ou seja, a partir de um resultado positivo da sorologia, deverá ser realizado primeiramente o teste de qPCR. Em caso negativo deste, a metodologia de WB deverá ser aplicada, a fim de evitar resultados falso negativos. Com a aplicação do algoritmo aqui proposto, o custo e o tempo para a realização do diagnóstico para o HTLV-1/2 será sensivelmente reduzido. Desta forma, este teste permitirá o amplo acesso ao diagnóstico confirmatório por instituições públicas e privadas, associado à conclusão segura do diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2 no país.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

- ✓ A região gênica viral *pol* do HTLV foi definida como alvo das reações de PCR em tempo real (qPCR), pois se mostrou específica e adequada para a plataforma molecular desenvolvida;
- ✓ O *kit* de extração de DNA a partir do sangue total do fabricante B apresentou melhor desempenho pois houve alto rendimento e baixo coeficiente de variação na recuperação do DNA extraído;
- ✓ Foi produzido um controle positivo único que contém DNA do HTLV-1 e HTLV-2 (MT-2+GU), o qual manteve-se estável em todas as reações de qPCR;
- ✓ A utilização do gene endógeno da beta-globina como controle interno de amplificação permitiu o monitoramento dos procedimentos pré-analíticos e analíticos do teste em questão;
- ✓ A detecção do HTLV-1, HTLV-2 e controle interno utilizando o sistema *multiplex* de qPCR apresentou alta sensibilidade e especificidade;
- ✓ O teste desenvolvido neste trabalho apresentou 100% de especificidade analítica;
- ✓ O teste desenvolvido foi capaz de detectar 2,81 a 5,54 cópias/reação para HTLV-1 e 7,02 a 17,21 cópias/reação para HTLV-2, mostrando-se mais sensível quando comparado aos métodos descritos na literatura;
- ✓ A plataforma de qPCR desenvolvida neste trabalho foi capaz de diagnosticar a infecção em 94,6% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e 78,6% dos indivíduos infectados pelo HTLV-2. Ainda, este apresentou 100% de especificidade diagnóstica ao analisar indivíduos não infectados;
- ✓ O teste desenvolvido é preciso e adequado para a realização do diagnóstico molecular da infecção pelo HTLV-1/2. Além disso, trata-se de um teste robusto capaz de diagnosticar amostras com diferentes cargas provirais em uma mesma placa, sem o risco de contaminação cruzada das amostras negativas;
- ✓ A plataforma molecular *multiplex* desenvolvida neste trabalho pode ser implementada na confirmação do diagnóstico do HTLV-1/2 como alternativa e/ou complemento ao WB em casos de sorologia positiva para HTLV-1/2.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, A.; AKAHATA, Y.; JACOBSON, S. The prevalence and significance of HTLV-I/II seroindeterminate Western blot patterns. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1320-31, Aug 2011.

ADAUI, V. et al. SYBR Green-based quantitation of human T-lymphotropic virus type 1 proviral load in Peruvian patients with neurological disease and asymptomatic carriers: influence of clinical status, sex, and familial relatedness. **J Neurovirol**, v. 12, n. 6, p. 456-65, Dec 2006.

ALBRECHT, B. et al. Quantification of human T-cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. **J Virol Methods**, v. 75, n. 2, p. 123-40, Nov 1998.

ANDRADE, R. G. et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 2, p. 111-5, Mar-Apr 2010.

ARAUJO, A. Q. et al. Progression of neurological disability in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **J Neurol Sci**, v. 129, n. 2, p. 147-51, Apr 1995.

BARBOSA, H. S. **Linfomas e leucemias associados a infecção pelo HTLV-I no Estado da Bahia** 1997. PhD. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

BERNEMAN, Z. N. et al. Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 7, p. 3005-9, Apr 1 1992.

BESSON, G.; KAZANJI, M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation, and quantification of human T-cell leukemia virus types 1, 2, and 3. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 1129-35, Apr 2009.

BITTENCOURT, A. L. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **Am J Clin Pathol**, v. 128, n. 5, p. 875-82, Nov 2007.

BRUNA C. ARRUDA, R. A. L., PAULA LOUREIRO, LUCAS BRANDÃO, PAULO SOUZA, WAYNER V. SOUZA, YARA M. GOMES. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in patients in the Hematologia da

Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. **REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**, v. 5, p. 384 - 389, 2008.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 3, p. 550-76, Jul 2010.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. **Rev Panam Salud Publica**, v. 19, n. 1, p. 44-53, Jan 2006.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 5, p. 499-508, Sep-Oct 2002.

CATALAN-SOARES, B. et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 3, p. 926-31, May-Jun 2005.

CATALAN-SOARES, B. C. et al. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. **Med Microbiol Immunol**, v. 198, n. 1, p. 1-3, Feb 2009.

COFFIN, J. M. Genetic diversity and evolution of retroviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 176, p. 143-64, 1992.

COOPER, S. A.; VAN DER LOEFF, M. S.; TAYLOR, G. P. The neurology of HTLV-1 infection. **Pract Neurol**, v. 9, n. 1, p. 16-26, Feb 2009.

COSTA, E. A.; MAGRI, M. C.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from Sao Paulo, Brazil. **J Virol Methods**, v. 173, n. 2, p. 280-6, May 2011. I

DE THE, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 9, n. 5, p. 381-6, May 1993.

DEHEE, A. et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **J Virol Methods**, v. 102, n. 1-2, p. 37-51, Apr 2002.

ESTES, M. C.; SEVALL, J. S. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV I or II. **Mol Cell Probes**, v. 17, n. 2-3, p. 59-68, Apr-Jun 2003.

FEUER, G.; GREEN, P. L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5996-6004, Sep 5 2005.

FUJINO, T.; NAGATA, Y. HTLV-I transmission from mother to child. **J Reprod Immunol**, v. 47, n. 2, p. 197-206, Jul 2000.

GABBAI, A. A. et al. Selectivity of human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 49, n. 6, p. 664-71, Dec 1993.

GALLO, R. C.; SLISKI, A.; WONG-STAAAL, F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. **Lancet**, v. 2, n. 8356, p. 962-3, Oct 22 1983.

GAUDRAY, G. et al. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. **J Virol**, v. 76, n. 24, p. 12813-22, Dec 2002.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, n. 8452, p. 407-10, Aug 24 1985.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Front Microbiol**, v. 3, p. 388, 2012.

GESSAIN, A.; GALLO, R. C.; FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **J Virol**, v. 66, n. 4, p. 2288-95, Apr 1992.

GONCALVES, D. U. et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 23, n. 3, p. 577-89, Jul 2010.

GOTUZZO, E. et al. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. **Infect Dis Clin North Am**, v. 14, n. 1, p. 211-39, x-xi, Mar 2000.

GOTUZZO, E. et al. Clinical characteristics of patients in Peru with human T cell lymphotropic virus type 1-associated tropical spastic paraparesis. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 7, p. 939-44, Oct 1 2004.

HALL, W. W. et al. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13 Suppl 1, p. S204-14, 1996.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 4, p. 413-7, Apr 1992.

HINO, S. et al. Association between maternal antibodies to the external envelope glycoprotein and vertical transmission of human T-lymphotropic virus type I. Maternal anti-env antibodies correlate with protection in non-breast-fed children. **J Clin Invest**, v. 95, n. 6, p. 2920-5, Jun 1995.

HOSHINO, H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. **Front Microbiol**, v. 3, p. 222, 2012.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1713-6, Mar 14 2003.

ISHAK, R. et al. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 11, n. 7, p. 813-21, Jul 1995.

ISHAK, R. et al. Detection of HTLV-IIa blood donors in an urban area of the Amazon Region of Brazil (Belem, PA). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 2, p. 193-7, Mar-Apr 1998.

JAIN, P. et al. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. **J Virol**, v. 83, n. 21, p. 10908-21, Nov 2009.

JASON, J. M. et al. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) p24 antibody in New York City blood product recipients. **Am J Hematol**, v. 20, n. 2, p. 129-37, Oct 1985.

JONES, K. S. et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. **Nat Med**, v. 14, n. 4, p. 429-36, Apr 2008.

JOURNO, C.; DOUCERON, E.; MAHIEUX, R. HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. **Future Microbiol**, v. 4, n. 4, p. 425-40, May 2009.

KAJIYAMA, W. et al. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. **J Infect Dis**, v. 154, n. 5, p. 851-7, Nov 1986.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-3, Nov 5 1982.

KAPLAN, J. E. et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 3, n. 11, p. 1096-101, 1990.

KINOSHITA, K. et al. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. **Gann**, v. 75, n. 2, p. 103-5, Feb 1984.

KRAMER, A. et al. Risk factors and cofactors for human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica. **Am J Epidemiol**, v. 142, n. 11, p. 1212-20, Dec 1 1995.

KURODA, Y.; FUJIYAMA, F.; NAGUMO, F. Analysis of factors of relevance to rapid clinical progression in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neurol Sci**, v. 105, n. 1, p. 61-6, Sep 1991.

KWOK, S. et al. Low incidence of HTLV infections in random blood donors with indeterminate western blot patterns. **Transfusion**, v. 30, n. 6, p. 491-4, Jul-Aug 1990.

LA GRENADE, L.; SCHWARTZ, R. A.; JANNIGER, C. K. Childhood dermatitis in the tropics: with special emphasis on infective dermatitis, a marker for infection with human T-cell leukemia virus-I. **Cutis**, v. 58, n. 2, p. 115-8, Aug 1996.

LAIRMORE, M. D.; HAINES, R.; ANUPAM, R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. **Curr Opin Virol**, v. 2, n. 4, p. 474-81, Aug 2012.

LAL, R. B. Delineation of immunodominant epitopes of human T-lymphotropic virus types I and II and their usefulness in developing serologic assays for detection of antibodies to HTLV-I and HTLV-II. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13 Suppl 1, p. S170-8, 1996.

LIU, H. et al. Sensitivity and specificity of human T-lymphotropic virus (HTLV) types I and II polymerase chain reaction and several serologic assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. **Transfusion**, v. 39, n. 11-12, p. 1185-93, Nov-Dec 1999.

MADELEINE, M. M. et al. HTLV-I and HTLV-II world-wide distribution: reanalysis of 4,832 immunoblot results. **Int J Cancer**, v. 54, n. 2, p. 255-60, May 8 1993.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. **Rev Clin Exp Hematol**, v. 7, n. 4, p. 336-61, Dec 2003.

_____. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. **Pathol Biol (Paris)**, v. 57, n. 2, p. 161-6, Mar 2009.

MANEL, N. et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6016-25, Sep 5 2005.

MANGANO, A. M. et al. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. **J Med Virol**, v. 74, n. 2, p. 323-7, Oct 2004.

MARIETTE, X. et al. Antibodies to HTLV-I in Sjogren's syndrome. **Lancet**, v. 345, n. 8941, p. 71, Jan 7 1995.

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, p. 27, 2005.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-80, Apr 2007.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Jpn J Cancer Res**, v. 83, n. 3, p. 236-9, Mar 1992.

MOENS, B. et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3682-91, Nov 2009.

MONTANHEIRO, P. et al. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in Sao Paulo City. **Virus Res**, v. 135, n. 1, p. 22-5, Jul 2008.

MORGAN, O. S. et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet**, v. 2, n. 8673, p. 1184-7, Nov 18 1989.

MUELLER, N. et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13 Suppl 1, p. S2-7, 1996.

MURPHY, E. L. et al. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. **Am J Epidemiol**, v. 133, n. 11, p. 1114-24, Jun 1 1991.

NADERI, M. et al. Design and development of a quantitative real time PCR assay for monitoring of HTLV-1 provirus in whole blood. **J Clin Virol**, v. 53, n. 4, p. 302-7, Apr 2012.

NAGAI, M. et al. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1858-61, Sep 15 2001.

NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **J Neurovirol**, v. 9, n. 2, p. 228-35, Apr 2003.

NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J Neurovirol**, v. 4, n. 6, p. 586-93, Dec 1998.

NISHIOKA, K. et al. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet**, v. 1, n. 8635, p. 441, Feb 25 1989.

NOWICKI, M. J. et al. High seroprevalence of anti-HTLV-I/II antibodies among solid organ donors necessitates confirmatory testing. **Transplantation**, v. 82, n. 9, p. 1210-3, Nov 15 2006.

NYAMBI, P. N. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) in Gabon: a prospective follow-up of 4 years. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 12, n. 2, p. 187-92, Jun 1 1996.

OHTSUKI, Y. et al. Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. **Arch Virol**, v. 73, n. 1, p. 69-73, 1982.

OKAJIMA, R. et al. High prevalence of skin disorders among HTLV-1 infected individuals independent of clinical status. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 11, p. e2546, Nov 2013.

OLIVEIRA, P.; CASTRO, N. M.; CARVALHO, E. M. Urinary and sexual manifestations of patients infected by HTLV-I. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 62, n. 2, p. 191-6, Apr 2007.

ORLAND, J. R. et al. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. **Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1588-94, Dec 9 2003.

OSAME, M. et al. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. **Ann Neurol**, v. 28, n. 1, p. 50-6, Jul 1990.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, n. 8488, p. 1031-2, May 3 1986.

PAIS-CORREIA, A. M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nat Med**, v. 16, n. 1, p. 83-9, Jan 2010.

PINTO, M. T. et al. HTLV-1/2 seroprevalence and coinfection rate in Brazilian first-time blood donors: an 11-year follow-up. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 54, n. 3, p. 123-9, May-Jun 2012.

PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Front Microbiol**, v. 3, p. 378, 2012.

POIESZ, B. J. et al. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. **Transfusion**, v. 40, n. 8, p. 924-30, Aug 2000.

POIESZ, B. J. et al. 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**, v. 77, n. 12, p. 7415-9, Dec 1980.

POMBO DE OLIVEIRA, M. S. et al. T-cell malignancies in Brazil. Clinico-pathological and molecular studies of HTLV-I-positive and -negative cases. **Int J Cancer**, v. 60, n. 6, p. 823-7, Mar 16 1995.

PROIETTI, F. A. **Seroprevalence correlates of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type II, human T-cell leukaemia/lymphoma virus type II / human immunodeficiency virus type 1 serostatus and clinical manifestations of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type II infection among intravenous drug users in Baltimore, Maryland.** 1992. Ph.D. School of Hygiene and Public Health Johns Hopkins Baltimore.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058-68, Sep 5 2005.

ROCHA-JUNIOR, M. C. et al. Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms are implicated on proviral load and susceptibility to human T-lymphotropic virus type 1 infection. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 2, p. 143-50, Aug 2012.

RODRIGUES, E. S. et al. HTLV-1 infects human mesenchymal stromal cell in vitro and modifies their phenotypic characteristics. **Virology**, v. 449, p. 190-9, Jan 20 2014.

ROMAN, G. C.; OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet**, v. 1, n. 8586, p. 651, Mar 19 1988.

ROMAN, G. C. et al. Tropical spastic paraparesis in the Seychelles Islands: a clinical and case-control neuroepidemiologic study. **Neurology**, v. 37, n. 8, p. 1323-8, Aug 1987.

ROSADAS, C. et al. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. **J Virol Methods**, v. 193, n. 2, p. 536-41, Nov 2013.

ROUS, P. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. **J Exp Med**, v. 13, n. 4, p. 397-411, Apr 1 1911.

SAKSENA, N. K. et al. LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. **Virology**, v. 189, n. 1, p. 1-9, Jul 1992.

SANITÁRIA, A. N. D. V. **Manual técnico para a investigação da transmissão de doenças pelo sangue**. Brasília 2004.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 12, p. 3618-22, Jun 1983.

SHIMOTOHNO, K. et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 10, p. 3101-5, May 1985.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br J Haematol**, v. 79, n. 3, p. 428-37, Nov 1991.

SOLDAN, S. S. et al. HTLV-I/II seroindeterminate Western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. **J Infect Dis**, v. 180, n. 3, p. 685-94, Sep 1999.

SONG, K. J. et al. Sequence and phylogenetic analyses of human T cell lymphotropic virus type 1 from a Brazilian woman with adult T cell leukemia: comparison with virus strains

from South America and the Caribbean basin. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 1, p. 101-8, Jan 1995.

TAJIMA, K. et al. Epidemiological analysis of the distribution of antibody to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen: possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. **Gann**, v. 73, n. 6, p. 893-901, Dec 1982.

TAKENOUCHI, H. et al. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. **Int J Cancer**, v. 128, n. 6, p. 1335-43, Mar 15 2011.

TALLEDO, M. et al. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. **J Med Virol**, v. 82, n. 3, p. 460-6, Mar 2010.

TAMEGAO-LOPES, B. P. et al. [HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 6, p. 548-52, Nov-Dec 2006.

THORSTENSSON, R.; ALBERT, J.; ANDERSSON, S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. **Transfusion**, v. 42, n. 6, p. 780-91, Jun 2002.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481-92, Sep 1977.

URETA-VIDAL, A. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **Int J Cancer**, v. 82, n. 6, p. 832-6, Sep 9 1999.

VAN PROOYEN, N. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 48, p. 20738-43, Nov 30 2010.

VERDIER, M. et al. Comparison of immunofluorescence, particle agglutination, and enzyme immunoassays for detection of human T-cell leukemia virus type I antibody in African sera. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 9, p. 1988-93, Sep 1990.

VERDIER, M. et al. Confirmatory tests for human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): western blot compared with RIPA on African sera. **J Virol Methods**, v. 30, n. 3, p. 283-9, Dec 1990. ISSN 0166-0934

VERNANT, J. C. et al. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. **Ann Neurol**, v. 21, n. 2, p. 123-30, Feb 1987.

VITONE, F. et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) prevalence and quantitative detection of DNA proviral load in individuals with indeterminate/positive serological results. **BMC Infect Dis**, v. 6, p. 41, 2006.

VRIELINK, H.; ZAAIJER, H. L.; REESINK, H. W. The clinical relevance of HTLV type I and II in transfusion medicine. **Transfus Med Rev**, v. 11, n. 3, p. 173-9, Jul 1997.

>.

WATERS, A. et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. **J Clin Virol**, v. 52, n. 1, p. 38-44, Sep 2011.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 22, p. 7994-9, May 31 2005. ISSN 0027-8424

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. **Int J Hematol**, v. 94, n. 5, p. 435-42, Nov 2011.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 6, p. 2031-5, Mar 1982.

YOSHIDA, M. et al. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 8, p. 2534-7, Apr 1984. ISSN 0027-8424

ZARRANZ IMIRIZALDU, J. J. et al. Post-transplantation HTLV-1 myelopathy in three recipients from a single donor. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 74, n. 8, p. 1080-4, Aug 2003.

ZARRANZ, J. J. et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) associated myelopathy acquired through a liver transplant. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 71, n. 6, p. 818, Dec 2001. 0022-3050 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11762319> >.

ZEHENDER, G. et al. High prevalence of false-negative anti-HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 13, n. 13, p. 1141-6, Sep 1 1997.

ANEXOS

ANEXO I - Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa

Fls. N. 34
 Proc. N. 67
 Pub.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

CÓPIA

Ribeirão Preto, 23 de fevereiro de 2010

Ofício nº 478/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA MOLECULAR IN HOUSE PARA A DIAGNÓSTICO CONFIRMATÓRIO DA INFECÇÃO PELO HTLV”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 302ª Reunião Ordinária realizada em 22/02/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12027/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MAURÍCIO CRISTIANO ROCHA JUNIOR
DRª SIMONE KASHIMA HADDAD (Orientadora)
 Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto - FUNDHERP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
 FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
 Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
 Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO II - Termo de Consentimento livre e esclarecido dos pacientes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “**Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular *in house* para o Diagnóstico Confirmatório da infecção pelo HTLV**”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Simone Kashima Haddad

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento.

6. O que é HTLV?

Esta sigla significa vírus linfotrópico de células T humanas.

Como ele é transmitido?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho.

O que ele causa?

A grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos ou no sangue.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 20 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A colheita de sangue será realizada no braço, após a assepsia, com seringas e agulhas descartáveis e por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas no local da punção (acúmulo de sangue debaixo da pele) e sensação dolorosa.

7. Porque esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa proporcionará um diagnóstico rápido, seguro e de baixo custo para a infecção pelo HTLV-1/2 permitindo assim a conclusão segura do quadro clínico do paciente.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Maurício Cristiano Rocha Junior/Evandra Strazza Rodrigues/Virgínia Mara de Deus ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

Eu, _____

RG n°: _____, autorizo a retirada de 20 mL do meu sangue através de punção venosa para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do paciente – Registro

Simone K.Haddad/ Prof. Dr. Dimas T. Covas
Pesquisadores Responsáveis

ANEXO III - Termo de Consentimento livre e esclarecido dos pacientes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

NOME DA PESQUISA: **“Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular *in house* para o Diagnóstico Confirmatório da infecção pelo HTLV”**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Simone Kashima Haddad, Svetoslav Nanev Slavov, Maurício Cristiano Rocha Junior, Kátia Kaori Otaguiri, Daiane Fernanda dos Santos, Evandra Strazza Rodrigues e Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas.

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento.

8. O que é HTLV?

Esta sigla significa vírus linfotrópico de células T humanas.

Como ele é transmitido?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho.

O que ele causa?

A grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos ou no sangue.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 20 mL de sangue (o equivalente a 4 colheres de sopa). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A colheita de sangue será realizada no braço, após a assepsia (limpeza), com seringas e agulhas descartáveis e por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas no local da punção (acúmulo de sangue debaixo da pele) e sensação dolorosa.

9. Porque esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa proporcionará um diagnóstico rápido, seguro e de baixo custo para a infecção pelo HTLV-1/2 permitindo assim a conclusão segura do quadro clínico do paciente. Uma das fases de teste deste diagnóstico é a chamada especificidade analítica, na qual será verificada se existe algum tipo de reação cruzada com outros tipos de vírus, dentre eles o HIV, o HBV e o HCV, ou seja, verifica se o teste em desenvolvimento consegue detectar somente o HTLV-1/2 e não outros tipos virais.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não lhe trará benefício direto, ficando à seu critério a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Maurício Cristiano Rocha Junior/Evandra Strazza Rodrigues/Virgínia Mara de Deus ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

() Sim, eu concordo em participar do estudo e autorizo a coleta de 20mL de meu sangue através de punção venosa para a realização da pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

Nome do voluntário o TCLE
(datilografado ou em letra de fôrma)

Assinatura do voluntário

Data

Nome do pesquisador que aplicou
o TCLE (datilografado ou em letra de fôrma)

Assinatura do pesquisador que
aplicou o TCLE

Data

ANEXO IV - Termo de Consentimento livre e esclarecido dos controles

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

NOME DA PESQUISA: **“Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular *in house* para o Diagnóstico Confirmatório da infecção pelo HTLV”**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Simone Kashima Haddad, Svetoslav Nanev Slavov, Maurício Cristiano Rocha Junior, Kátia Kaori Otaguiri, Daiane Fernanda dos Santos, Evandra Strazza Rodrigues e Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas.

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, o seu seguimento no banco de sangue continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para a sua doação.

10. O que é HTLV?

Esta sigla significa vírus linfotrópico de células T humanas.

Como ele é transmitido?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho.

O que ele causa?

A grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos ou no sangue.

Como você, doador (a), vai participar da pesquisa?

Para a realização deste trabalho, precisamos da colheita de sangue de pessoas que **NÃO** estejam contaminadas com este vírus. Será importante para utilizar como controle **negativo** para esta pesquisa. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 04 mL de sangue (o equivalente a 1 colher de sopa). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A colheita de sangue será realizada no braço, após a assepsia (limpeza), com seringas e agulhas descartáveis e por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas no local da punção (acúmulo de sangue debaixo da pele) e sensação dolorosa.

11. Porque esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa proporcionará um diagnóstico rápido, seguro e de baixo custo para a infecção pelo HTLV-1/2 permitindo assim a conclusão segura do quadro clínico do paciente. Uma das fases de teste deste diagnóstico é a chamada especificidade diagnóstica, na qual será verificada se o teste em desenvolvimento é capaz de identificar corretamente os indivíduos saudáveis.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não lhe trará benefício direto, ficando à seu critério a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Maurício Cristiano Rocha Junior/Evandra Strazza Rodrigues/Virgínia Mara de Deus ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

() Sim, eu concordo em participar do estudo e autorizo a coleta de 4 mL de meu sangue através de punção venosa para a realização da pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

<hr/> <div>Nome do participante (datilografado ou em letra de fôrma)</div>	<hr/> <div>Assinatura do participante</div>	<hr/> <div>Data</div>
<hr/> <div>Nome do pesquisador que aplicou o TCLE (datilografado ou em letra de fôrma)</div>	<hr/> <div>Assinatura do pesquisador que aplicou o TCLE</div>	<hr/> <div>Data</div>