



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA**

**INCIDÊNCIA DE HTLV-1/2 EM CANDIDATOS À DOAÇÃO DE SANGUE  
DOAMAZONAS: UM ESTUDO OBSERVACIONAL COMPARANDO DIFERENTES  
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.**

**FELIPE ARAUJO DOS SANTOS**

**MANAUS-AM**

**2023**

**FELIPE ARAUJO DOS SANTOS**

**INCIDÊNCIA DE HTLV-1/2 EM CANDIDATOS À DOAÇÃO DE SANGUE DO  
AMAZONAS: UM ESTUDO OBSERVACIONAL COMPARANDO DIFERENTES  
MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia.

**Orientador:**Allyson Guimarães da Costa

**Coorientador:**Olindo Assis Martins Filho

**MANAUS-AM**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

S237ii DOS SANTOS, FELIPE ARAUJO  
Incidência de HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue do Amazonas: Um estudo observacional comparando diferentes métodos de diagnóstico. / FELIPE ARAUJO DOS SANTOS. Manaus : [s.n], 2023.  
88 f.: color.; 36 cm.

Dissertação - Programa de pós-graduação em ciências aplicadas a hematologia e hemoterapia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Allyson Guimarães da Costa

Coorientador: Olindo Assis Martins Filho

1. HTLV. 2. Diagnóstico. 3. Citometria de fluxo. 4. FC - Duplex HTLV-1/2. 5. Hemocentro. I. Allyson Guimarães da Costa (Orient.). II. Olindo Assis Martins Filho (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Incidência de HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue do Amazonas: Um estudo observacional comparando diferentes métodos de diagnóstico.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 017/2023

Ao trigésimo primeiro dia do mês de agosto do ano de 2023, às 09h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação do discente **Felipe Araújo dos Santos**, sob o título: “**Incidência de HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue do Amazonas: Um Estudo Observacional Comparando Diferentes Métodos de Diagnóstico**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Allyson Guimarães da Costa** e coorientador o Prof. Dr. **Olindo Assis Martins Filho**, segundo encaminhamento da Prof.ª Dr.ª **Andréa Monteiro Tarragô**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – Presidente (UFAM / HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 887.165.032-87
Prof.ª Dr.ª Josiane da Silva Quetz – Membro (UNIFENAS-BH)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 036.200616-77
Prof.ª Dr.ª Andréa Monteiro Tarragô – Membro (HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura: CPF: 717.410.892-04

O parecer final do Exame de Defesa foi:

Aprovado

Não Aprovado

Presidente da Banca Examinadora

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta e todas as outras conquistas da minha vida  
a quem sempre acreditou e acredita, de onde quer que esteja  
me protegendo, a minha grande inspiração, minha vó Joana  
Araujo dos Santos*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Bondoso DEUS Pai, pelo dom da vida. A DEUS Filho, Jesus Cristo, por ser meu melhor amigo e por me suster em todas as horas. A DEUS Espírito Santo, pelo dom da inspiração, que me levou ao desejo de evoluir profissionalmente através do mestrado.

Agradeço aos meus amigos e família por todo apoio e incentivo nos momentos que precisei me sentir acolhido, os dois grupos acabam se misturando de uma forma que não consigo explicar, as vezes me sinto mais próximos da “família que escolhemos” do que o meio familiar em que cresci. Porém ambos me apoiaram em momentos distintos da caminhada profissional, sem eles com certeza seria mais dificultosa essa jornada. Minha mãe pelos conselhos e palavras de calma que sempre me deram tranquilidade e disposição para continuar, ao meu tio José Carlos pelo apoio nos primeiros passos da caminhada acadêmica, meu exemplo de dedicação e acolhimento no meio profissional.

Agradeço ao meu orientador, Allyson Guimarães por todos os ensinamentos, apoio e repreensão que me foram dadas, foram dois anos de muito ensinamento, correria, pressão emocional e adversidades nesse trajeto, porém conseguimos terminar mais essa fase de estudos em HTLV. Ao meu pequeno e seletivo grupo de ‘HTLVzes’, Cláudio Catão, Uzamor Henrique e Izabela Vasconcelos, que na minha ausência deram continuidade no projeto e asseguraram que todos os setores funcionassem bem para esse resultado. Ao amigo Fabio Magalhães, por todo suporte desde a primeira reunião e submissão do antigo projeto até as mudanças que houveram pelo caminho até hoje.

As ajudas que tivemos em campos com os quais não dominávamos com a Luciana Viana, Daniele de Sá, Regiane Costa e as colaboradoras do setor de sorologia Dra. Claudia Abrahim, Cilene e Rosilene, que apesar de suas demandas da rotina na fundação foram parceiras ao aceitar mais a nossa demanda do projeto. A FIOCRUZ-Minas e os queridos Márcio Sobreira, Julia Pereira, Marina Silvestrini, Olindo Assis Martins e Andrea Teixeira, pela receptividade, ajuda, paciência e contribuição nesses e nos trabalhos que ainda virão pela frente.

Agradeço imensamente ao meu amor, André Luiz que teve a má sorte de me conhecer na mesma época que iniciei o mestrado, ‘tadinho’, por todas as vezes que ele acreditou em mim quando nem eu conseguia esse feito, pelas vezes que ele teve oportunidades e motivos para ir e mesmo assim optou por ficar e me agüentar, sou grato pela sua vida junto a minha, pela sua

paciência comigo, por sempre estar disposto a ver o lado bom em mim e a tudo a nossa volta, por me esperar passar por essa fase e me incentivar a iniciar a próxima que com certeza não será fácil. Obrigado ‘miavida’ por estar comigo nessa conquista e em todas as outras que com certeza virão em nossas vidas.

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), pela estrutura e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia (PPGH), a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e aos professores, por todo conhecimento transmitido, paciência e motivação. A secretaria do programa pelo suporte, dedicação e paciência com nossos relatórios e documentos, vocês merecem muito o meu reconhecimento. Nossa coordenadora Andrea Tarragô pelas conversas e trocas de experiências e experimentos bem como pelo incentivo e auxílio a todos os alunos do programa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo apoio financeiro.

## **DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do Projeto PROCAD-Amazônia 2018 (#88881.200581/2018-01), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), através das resoluções nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019 (Programa Pró-Estado) e Edital nº 012/2022 (Programa STARTUP PARA O SUS/FAPEAM), por financiarem direta e indiretamente esta pesquisa.

**EPIGRAFE**

*“Compare a si mesmo com quem você foi ontem e não com quem outra pessoa é hoje.”*

## RESUMO

O vírus linfotrófico de células T humana é um retrovírus, que foi descoberto em 1980 e especificamente isolado de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Ao longo dos anos, tipos do HTLV foram identificados, totalizando quatro tipos (HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4). Embora a maioria dos infectados por um ou mais tipos sejam portadores assintomáticos, 2 a 5% dessa população infectada pode apresentar encefalomielopatia crônica e mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). As principais metodologias para identificação e diagnóstico do vírus são a quimioluminescência (CLIA) e ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizados na fase qualitativa ou triagem, além do Western Blot (WB) e Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), para confirmação e diagnóstico. Os testes possuem diversas particularidades e seu uso isolado pode ser falho nessa avaliação, embora sua utilização combinada pode gerar altos custos aos serviços de saúde. Diante disso, o presente estudo avaliou a incidência de HTLV-1/2 em doadores de sangue atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), utilizando diferentes métodos para identificação dessa infecção. Foram encontrados 409 doadores de sangue com sorologia positiva para o HTLV-1/2 pelo ensaio CLIA, durante o período de levantamento (2018-2022), com incidência de 0.15%. Apenas 151 indivíduos retornaram ao hemocentro, realizaram nova coleta e aceitaram participar do estudo. Após a realização dos testes, observamos que CLIA apresentou excelente desempenho como etapa de triagem, exibindo sensibilidade de 100%. Embora os dados de acurácia (62.4%) não sejam animadores, observamos que outro ensaio, o FC-Simplex, apresentou melhor desempenho (acurácia = 91.5%) para o diagnóstico da infecção. Adicionalmente, a extensão desse ensaio, o FC-Duplex, apresentou concordância de 100% com os resultados obtidos pelo método padrão-ouro estabelecido no estudo (Western Blot) para distinção entre HTLV-1 e 2. Concluímos que é baixa a incidência (0,15%) do vírus em nossa população. Além disso, os métodos avaliados apresentaram bons resultados, e as novas metodologias demonstraram ser promissoras para confirmação do diagnóstico e identificação do tipo de vírus causador da infecção após os testes de triagem.

**Palavras-chave:** HTLV; Diagnóstico; Citometria de fluxo; FC – Duplex HTLV-1-2 IgG1; Hemocentro.

## ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus is a retrovirus, which was discovered in 1980 and specifically isolated from a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Over the years, HTLV types have been identified, totaling four types (HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4). Although most of those infected with one or more types are asymptomatic carriers, 2 to 5% of this infected population may present with chronic encephalomyelopathy and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). The methodologies for virus diagnosis are: chemiluminescence (CLIA); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), used in the qualitative phase or screening for the virus, this phase is responsible only for its detection in the sample of the infected. The confirmation or distinction of the virus is performed by: western blot (WB) or polymerase chain reaction (PCR), in the confirmatory phase. The tests have negative particularities that decrease their diagnostic capacity being used separately or increase their high costs when used together. Therefore, the present study evaluated the incidence of HTLV-1/2 in blood donors treated at the HEMOAM foundation from 2018 to 2022, using commercial and conventional methodologies for diagnosis as well as new FC-Duplex and FC-Simplex HTLV-1/2 IgG1 assays, in addition to the evaluation of these methodologies, updating sociodemographic data of blood donor infection in Amazonas. A total of 409 donors were found to be unfit for blood donation by CLIA during the survey period. Only 151 individuals of the total found accepted through a free and informed consent form (ICF) to participate in the project. We conclude with the evaluations carried out the maintenance of the low prevalence (0.15%) of the virus among the studied group. The good performances of the WB and CLIA methodologies in their due stages of use, as well as the promise of using the FC-Simplex and FC-Dlupex HTLV-1/2 IgG1 assays as a diagnostic method for the virus.

Keywords: HTLV; Diagnosis; Flow cytometry; FC – Duplex HTLV-1-2 IgG1; Blood Center.

## LISTA DE FIGURAS e TABELAS

Figura 1– Estrutura do vírus HTLV .....	12
Figura 2– Distribuição mundial dos subtipos de HTLV-1 e possíveis rotas de disseminação do vírus .....	13
Figura 3– Sinapse virológica .....	14
Figura 4– Distribuição mundial de HTLV-1 em áreas endêmicas .....	18
Figura 5– Resultados dos testes de CLIA.....	36
Figura 6– Distribuição de Amostras negativas e positivas pela CLIA.....	37
Tabela 1– Resultado de western blot.....	38
Figura 7– Metodologia Western Blot associada à CLIA.....	38
Figura 8– Metodologia FC-Simplex IgG1 HTLV-1/2, associada a Quimioluminescência e Western Blot.....	39
Figura 9– Resultado da metodologia FC-Duplex IgG1 HTLV-1/2.....	40
Tabela 2– Resultados dos questionários e testes para HTLV.....	41
Figura 10– CLIA vs Western Blot.....	43
Figura 11– CLIA vs FC-Simplex IgG1 .....	44
Figura 12– Western Blot vs FC-Duplex IgG1 .....	45
Figura 13- Bandas de identificação das proteínas do HTLV-1/2 no teste Western Blot HTLV Blot 2.4.....	72

## LISTADEABREVIATURAS

ATLL	Leucemia linfoma de células T adulta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLIA	Quimioluminescência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FC-Duplex HTLV-1/2 IgG1	Flow Cytometry duplex HTLV-1/2 IgG1
FC-Simplex HTLV-1/2 IgG1	Flow cytometry simplex HTLV-1/2 IgG1
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GIPH	Grupo integrado de pesquisas em HTLV
HTLV	Vírus linfotrópico de células T de humanos
HIV	Virus da imunodeficiência humana
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1 / Paraparesia espástica tropical
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
LTR	Repetição terminal longa
MT-2	Linhagem celular infectada com HTLV-1
MoT	Linhagem celular infectada com HTLV-2
Provírus	Célula hospedeira infectada com genoma viral
PTLV	Vírus linfotrópico de células T de primatas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase
SBF	Soro Bovino Fetal
SAME	Setor de atendimento médico e estatístico
STLV	Leucemia de células T símias
TAX	Proteína transativadora viral de HTLV
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
ULR	Unidade de luz relativa
WB	Western blot

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
2.1 ETIOLOGIA.....	18
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	24
2.3 TRANSMISSÃO .....	27
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS.....	28
2.5 DIAGNÓSTICO .....	31
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA:.....	35
5.2 MODELO DO ESTUDO:.....	35
5.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO:.....	36
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA: .....	36
5.5 ASPECTOS ÉTICOS:.....	36
5.6 GARANTIAS ÉTICAS AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA:.....	36
5.7 CONTATO COM OS INDIVÍDUOS POSITIVOS PARA HTLV:.....	36
5.8 OBTENÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS:.....	37
5.9 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS:.....	37
5.10 QUIMIOLUMINESCÊNCIA COM O KIT ALINITY'S HTLV-1/2:.....	37
5.11 WESTERN BLOT COM O KIT MP DIAGNÓSTICOS BLOT 2.4 HTLV-1/2:.....	38
5.12 FC-DUPLEX HTLV-1/2 IGG1:.....	39
5.13 ANÁLISE DOS DADOS:.....	40
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>

<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>
<b>9</b>	<b>APENDICE .....</b>	<b>68</b>
9.1	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
9.2	EQUIPE DE EXECUÇÃO DO PROJETO.....	68
9.3	FINANCIAMENTO .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
9.4	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-HEMOAM.....	68
9.5	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DE COLETAS E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS - POP.....	69
9.6	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SORO PARA OS TESTES DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA (CMIA) PARA HTLV-1/2 COM O KIT ALINITY'S. ....	73
9.7	TESTE DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA COM O KIT ALINITY'S HTLV-1/2.....	76
9.8	TESTE DE WESTERN BLOT COM O KIT HTLV-1/2 BLOT 2.4 - MP DIAGNOSTICS ...	83

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humana (HTLV) descoberto na década de 80 vem sendo estudado no decorrer dos anos com poucos investimentos do ponto de vista para a erradicação do mesmo, quando comparados à vírus considerados mais agressivos como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus das hepatites, vírus do Epstein barr e entre outros. O HTLV acaba sendo negligenciado por não ser tão agressivo logo nos primeiros anos, e se caso chegar a ser sintomático, como nas poucas vezes que o mesmo se apresenta como patologia, dos quatro tipos virais conhecidos no meio científico apenas o tipo 1 é capaz de ocasionar patologia no hospedeiro humano<sup>1,2</sup>. O tipo 2 é considerado com importância devido ao fato de haver contaminação tanto de animais para humanos como de humanos para outros humanos, porém este ainda não possui caracterização como agente causador de nenhuma patologia, por coincidência o mesmo é encontrado em pacientes que possuem infecções de células pilosas e neurodegenerativas iguais as causadas pelo HTLV-1, mas não como sendo causador das mesmas<sup>3,4</sup>. Os tipos 3 e 4 possuem menos estudos ainda devido ao fato de não haverem casos de contaminação entre humanos e não apresentaram importância patológica na população<sup>5,6</sup>.

Acredita-se que o vírus possua abrangência mundial, porém silenciosa devido ao fato do vírus não possuir agressividade considerável nos primeiros anos de contato com o seu hospedeiro humano, porém regiões onde se tem convívio com seus reservatórios antecessores aos humanos, os primatas não humanos, o HTLV tem demonstrado índices de contágio mais preocupantes, áreas como Japão, Ilhas Caribenhas, África, América do Sul, algumas regiões da Romênia e Oriente Médio, estima-se que a população de infectados seja de pelo menos 20 milhões em todo o mundo<sup>1,7</sup>. Os meios de transmissão do vírus são parecidos com o HIV, por contatos sexuais desprotegidos de preservativos, compartilhamento de perfurocortantes contaminados, transplantes de órgãos, bolsas de sangue e de mãe para bebê, principalmente através do aleitamento materno, sendo este último um dos mais preocupantes pois mães e bebês possuem uma imunidade fragilizada durante os meses de gestação e após esse período também, que acabam tornando esse período propício a manifestação de doença caso o vírus compartilhado seja o tipo 1<sup>7-9</sup>.

As metodologias utilizadas para o diagnóstico do vírus são necessárias para a identificação de indivíduos responsáveis pela propagação do vírus levando em consideração

que o mesmo não possui tratamento para sua erradicação. A prevenção mais eficaz quanto à contaminação e disseminação são as informações a indivíduos contaminados com HTLV, estes são instruídos a fazer uso de preservativos durante o ato sexual ou a buscar por medidas alternativas de aleitamento durante o período de recém nascido<sup>2,4,6</sup>.

Atualmente é adotado que o vírus passe por duas fases no diagnóstico, a primária onde as metodologias de ensaio imunoenzimático (ELISA) e quimioluminescência (CLIA) fazem o diagnóstico qualitativo dos anticorpos presentes (uma resposta humoral ao vírus), após essa etapa, os indivíduos que se mantiverem positivos conforme a repetição destes<sup>2,10,11</sup> são submetidos a testes da etapa confirmatória na qual são utilizados testes com reações moleculares (qPCR) ou identificação de anticorpos contra proteínas sintéticas dos vírus capazes de sinalizar mediante anticorpos contidos nas amostras de indivíduos contaminados com o vírus pelo western blot (WB), até o momento essas são as metodologias mais acessíveis e de maior alcance para a confirmação da etapa anterior bem como a distinção da tipagem viral<sup>4,12</sup>.

Os testes de diagnóstico apresentam dificuldades na realização de identificação e tipagem utilizando apenas uma metodologia, na maioria das vezes são necessários que seja utilizada mais de duas ou três metodologias com o intuito de certificar determinado paciente como real infectado pelo HTLV, o WB considerado até então a metodologia com mais acessibilidade e padronização para o diagnóstico e tipagem viral, apresenta dificuldade muitas das vezes com quadros incompletos de reação das proteínas virais no teste, por padronização é adotado que a amostra seja considerada reativa quando for identificada anticorpos contra uma proteína da região gag (p19 e/ou p24) e contra duas proteínas do envelope viral (rgp46 I ou II e gd21)<sup>12,13</sup>, totalizando três anticorpos, no mínimo, reativas no teste, caso não ocorra o quadro completo de reação esse teste é considerado indeterminado, algumas vezes ocorre essa indeterminação por reatividades cruzadas devido a período de soroconversão do próprio HTLV, outras contaminações virais ou parasitárias, como no caso da reatividade a proteínas do *Plasmodium falciparum* que pode ocasionar competitividade sorológica no teste à algumas proteínas da região gag, mas nenhuma da região env, que acaba atingindo também outros testes como CLIA e ELISA, sendo necessários ajustes como lisados de *P. falciparum* para inibir essa reatividade em alguns testes<sup>14</sup>. As dificuldades das metodologias limitam que centros de pesquisa e laboratórios de rotina façam uso da investigação em grande escala para

HTLV, sendo assim se fazem necessários que trabalhos abordem essa problemática com intuito de auxiliar nessas limitações e investigara eficácia de metodologias já utilizadas no meio comercial<sup>1,4,15</sup>.

Atualmente os testes que são utilizados para diagnosticar o HTLV 1-2 possuem limitações de sensibilidade e especificidade, observa-se ainda a necessidade da utilização paralela de vários métodos (Quimioluminescência, ELISA, Western Blot, RT-PCR). O custo elevado desses testes disponíveis comercialmente para o diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1/2, representa um dos grandes desafios encontrados pelos pesquisadores envolvidos em estudos sobre o HTLV, bem como a observação real da contaminação e abrangência de indivíduos infectados pelo vírus.

As metodologias utilizadas são capazes de realizar o diagnóstico a fim de assegurar que indivíduos infectados sejam direcionados para atendimento e acompanhamento específico quanto à sua sorologia, bem como em nível de informação para que esses pacientes sejam instruídos para a sua segurança e de seus parceiros ou familiares com fins de limitação de propagação do vírus nos meios onde estes convivem, como um exemplo prático, bolsas de sangue contaminadas com o vírus serão desprezadas antes de seu uso em procedimentos que as mesmas seriam empregadas, levando em consideração a falta de um medicamento ou vacina que previna ou extingue o vírus de circulação.

Nesse contexto, há necessidade de inovações tecnológicas que utilizem novas preparações antigênicas e estratégias de ensaios competitivos em plataforma única, para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico confirmatório e diferencial com elevada sensibilidade e especificidade, bem como a avaliação das metodologias já utilizadas no mercado a fim de assegurar que estes sejam realmente confirmados como opções de uso na rotina laboratorial tanto de centros de pesquisa como de diagnósticos para exames de rotina.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Etiologia**

O vírus linfotrópico de células T humana é um retrovírus, que foi descoberto em 1980 e especificamente isolado de um paciente com linfoma cutâneo de células T<sup>4</sup>. No decorrer dos tempos outros tipos deste vírus foram identificados totalizando quatro tipos: HTLV-1, HTLV-

2, HTLV-3 e HTLV-4. Após a primeira identificação do vírus, em 1982 o HTLV-2 foi isolado de um paciente com tricoleucemia (leucemia de células pilosas)<sup>1</sup>, curiosamente, apesar do HTLV-2 ter sido isolado de um paciente com a doença leucêmica de células pilosas, ainda não foi comprovada nenhuma interação clínica de que o vírus tipo 2 seja o causador dessa doença. Os HTLV-1 e HTLV-2 possuem uma similaridade estrutural e enzimática entre si, inclusive por expressar duas proteínas importantes em suas estruturas, como as proteínas regulatórias TAX e REX, os mesmos ainda apresentam um transcrito de RNA e proteína produzida da fita de sentido negativo do genoma viral<sup>4</sup>.

Embora a maioria dos infectados por ambos os tipos de HTLV sejam portadores assintomáticos, 2 a 5% dessa população infectada pode vir a apresentar encefalomielopatia crônica e mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). No entanto, o HTLV-2 ainda não foi associado como agente causador de doença específica, o que se levou a imaginar que ambos não eram tão semelhantes assim<sup>4</sup>. O HTLV-2 apresenta diferenças antigênicas em comparação ao HTLV-1<sup>16</sup>. Segundo o estudo de Araujo et al.(2004), o HTLV-2 foi vinculado a uma doença neurológica semelhante ao HAM/TSP, mas que ainda não foi totalmente caracterizada<sup>17</sup>.

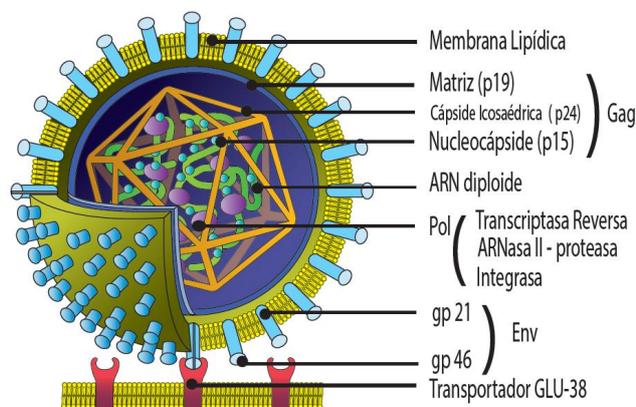
O terceiro tipo do vírus foi descoberto em 2005, em populações da República de Camarões, que tem contato com primatas não humanos, caçadores e pessoas que manuseiam carne de caça. Ainda não se sabe se o HTLV-3 pode ser transmitido entre humanos e se ele pode produzir doenças no hospedeiro como o vírus tipo 1<sup>6</sup>. No entanto, já se foi relatado casos isolados de HTLV-3 com certos tipos de doenças em regiões onde o mesmo foi inicialmente identificado, mas ainda se faz necessário que estes sejam melhor analisados e confirmados<sup>5</sup>.

Um quarto tipo do vírus ainda foi relatado em algumas publicações, no entanto, este não foi reconhecido pelo *International Committee on Taxonomy of viruses* (ICTV), porque até então o vírus consiste de uma única cepa humana isolada de um caçador (1863LE), que vive no Camarões<sup>6</sup>. Ensaio de western blot foram realizados, e os resultados foram considerados indeterminados para HTLV, além disso, ensaios filogenéticos sobre o suposto HTLV-4 concluíram que o mesmo constitui claramente um grupo viral monofilogenético e é característico a uma linhagem mais antiga conhecida como *Primate T-lymphotropic virus* (PTLV)<sup>18</sup>. Sua seqüência não é muito parecida com os outros tipos de vírus HTLV, fazendo

uma relação entre eles, este compartilha apenas de 62 e 71% de identidade nucleotídica com os tipos HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente<sup>1</sup>.

Os HTLV são vírus zoonóticos com contrapartes do vírus linfotrópico de células T símias (STLV) encontrado em macacos<sup>4</sup>. São constituídos de uma estrutura similar aos outros retrovírus, possuindo morfologia esférica e pleomórfica, que mede de 80 a 100nm de diâmetro, composto pelo envelope, um nucleocapsídeo e um nucleóide, apresenta em sua superfície pequenas espículas que envolvem toda a estrutura e recobrem por igual a superfície viral<sup>19</sup>. A constituição do vírus é típica da família retroviridae, anteriormente ele estava classificado ainda na subfamília oncovirinae, que atualmente compreende os atuais gêneros alfa, beta, gama, delta e epsilonvirus, todos estes considerados vírus oncogênicos causadores de sarcomas e leucemias. Dentro dessa classificação do gênero do HTLV, nota-se que eles compõem os deltaretrovírus, possuindo duas sequências de repetição terminal longa (LTR), localizados nas extremidades 5' e 3', onde possuem a função de promotor viral, tendo como principais proteínas estruturais gag, pol e env (Figura1)<sup>1,4</sup>.

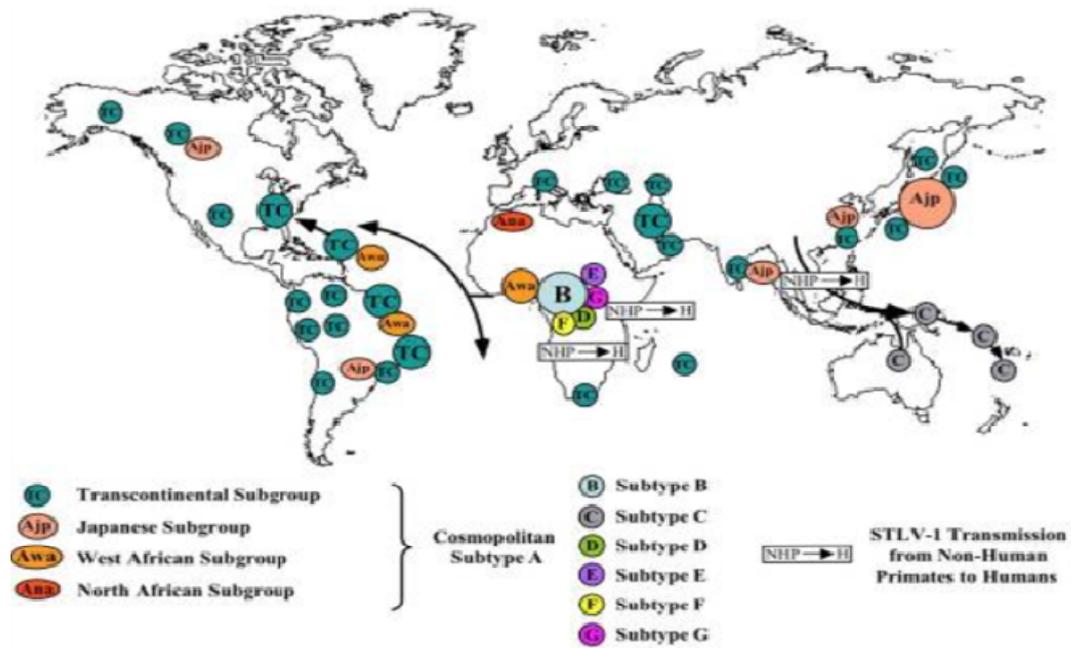
O material genético é composto de RNA fita simples envelopado, compactado em 8.685 nucleotídeos, que dispõe também de uma região identificadora adicional pX, responsável por codificar várias proteínas reguladoras, onde encontramos a proteína TAX, reconhecida como a proteína responsável pela fisiopatologia do vírus e a proteína REX que também está associada como peça fundamental na manutenção da infecção viral *in vivo*, além de controlar a síntese de proteínas estruturais em um nível pós transcricional, o vírus ainda conta com proteínas acessórias como P30II, p12 e p13<sup>20-22</sup>.



**Figura 1.** Estrutura do vírus HTLV e proteínas constituintes. Fonte: Regalado, NC. 2013

Os tipos HTLV-1 e HTLV2 são os mais bem estudados dentro dos tipos de vírus dessa família, principalmente por suas associações clínicas à patologias de grau maior e infecção interespecies, sendo o HTLV-1, bem mais pesquisado do que o HTLV-2, por conta de sua interação à mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)<sup>4</sup>. Ambos os tipos de vírus compartilham cerca de 70% de semelhança nucleotídica. O vírus do tipo 1 pode causar no hospedeiro sintomático doença inflamatória rara que causa distúrbios neurológicos contínuos e progressivos, bexiga neurogênica e distúrbios sensoriais das extremidades inferiores. Embora ainda não se tenha cura ou tratamento específico para o vírus em si, são utilizados imunomoduladores, como os corticosteróides, que tem se mostrado bastante positivos para evitar a progressão da doença HAM/TSP<sup>4,23</sup>.

O HTLV-1 pode ser subdividido em quatro tipos representados pelas primeiras letras do alfabeto em maiúsculo (A-D), Segundo Gessain et al. (2012) foram encontrados na África Central um número mais limitado de cepas que pertencem a outros subtipos raros (E, F, G), no entanto, essa divisão genética não está associada ao grau ou tipo de doença que o portador poderá apresentar, mas sim a localização geográfica desses pacientes<sup>9</sup>. O tipo A é o mais comumente diagnosticado, sendo este cosmopolita, o mesmo compreende ainda quatro grupos moleculares: o japonês, o transcontinental, o da África do norte e do leste (Figura 2)<sup>6,9</sup>. Estudos posteriores sugeriram também que o HTLV-2 fosse subdividido em quatro variações genéticas, representados também pelas primeiras letras do alfabeto, porém em minúsculo (a-d)<sup>24</sup>.



**Figura 2:** Distribuição mundial dos subtipos genéticos de HTLV-1 e possíveis rotas de disseminação do vírus.

Fonte: Gessain A, Cassar O. 2012

A infecção pelo HTLV-1 ocorre de forma mais eficiente através da transmissão por próvirus, que é a célula T infectada com o vírus e que precisa ter contato com outra célula T sadia para que seja realizado o processo de contaminação<sup>21</sup>. No entanto, já foi observado que pode acontecer a contaminação de células dendríticas por partículas virais livres, porém estes são casos pouco frequentes, mas que acabam por ser na maioria das vezes os passos iniciais para a chegada até a célula de interesse do vírus. Assim como nas células dendríticas, observou-se que células T CD8<sup>+</sup> podem ser considerados linfócitos alvos para contaminação pelo vírus, porém estes compõem apenas 5% de provirus de pacientes positivos, mas esta linhagem celular tem-se demonstrado ineficaz como um reservatório celular favorável a produção e manutenção de provirus. Por fim, foi descrito casos mais isolados ainda de monócitos e células dendríticas plasmocitóides contaminadas<sup>19,21</sup>.

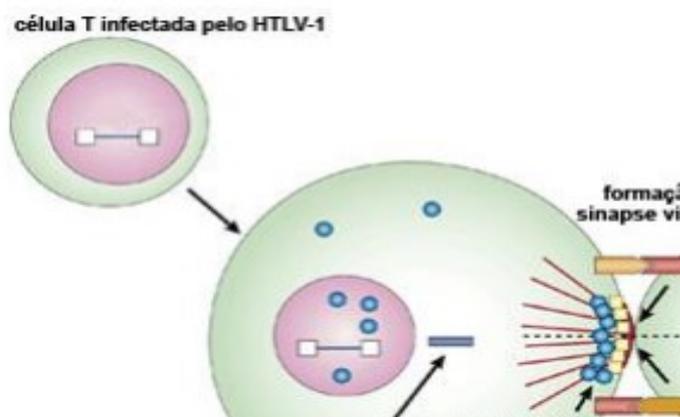
O vírus possui tropismo exclusivo por linfócitos T do tipo CD4<sup>+</sup>, visto que essa população celular possui em sua superfície o CCR4 que é um receptor de quimiocina, presente em células do tipo T reguladoras, Th2, células T de memórias e efetoras entre outros. Geralmente infectam células presentes na pele, característica importante na visualização de pacientes que são acometidos com ATLL provenientes de HTLV-1, pois estes apresentam alta infiltração nesse tecido por conta das linhagens celulares acometidas. O CCR4 possui dois

ligantes específicos o TARC/CCL17 e o MDC/CCL22 e ambos estão associados com a produção de anticorpos e reações alérgicas<sup>3,20</sup>.

A proteína TAX presente no genoma do HTLV tem como uma das suas funções a produção proviral de altos índices de MDC/CCL22 para que haja a atração e interação celular entre células T infectadas com HTLV e células T CD4+/CCR4+, realizando assim o que ficou conhecido como “sinapse virológica”, como demonstrado na Figura 3<sup>3</sup>. Este processo acaba por aumentar a transmissão do vírus entre provirus e linfócitos T sadios, o que torna os altos níveis de CCR4+ um marcador sugestivo para ATLL, sendo observado em mais de 90% dos casos. Alguns autores descrevem que esta é uma das características que diferencia o HTLV-1 dos outros retrovírus, como por exemplo o HIV onde ocorre a contaminação de linfócitos T CD4+ com partículas virais livres e os índices de carga viral extracelular podem ser quantificados com mais facilidade dependendo do estágio da doença. Essa característica é diferente no HTLV-1 onde os índices de carga viral extracelular são muito baixos levando em consideração sua necessidade do ambiente celular<sup>3,20,25</sup>.

Fábio A. B. Cabral

Dissertação



**Figura 3.** Sinapse virológica. Fonte: Cabral, F A. 2010

O vírus também possui outra característica particular, o HTLV-1 possui estrutura genética com alta estabilidade intracelular. Após a contaminação de células T sadias e sua integração ao novo genoma através da transcrição reversa onde o produto DNA é inserido na célula hospedeira. Além disso, o vírus possui duas formas principais de replicação viral in vivo: a primeira está condicionada à replicação infecciosa onde a re-expressão do provírus integrado produz um vírion novo dentro da célula; a segunda, através de divisão mitótica

proviral, onde acontece a replicação viral da célula infectada havendo a produção de toda estrutura necessária para a formação de novas células T infectadas. Apesar dessa replicação acontecer em menor escala em relação às condições fisiológicas, a transcrição do material genético do vírus ocorre com fidelidade expressiva<sup>20,25</sup>.

As condições de replicação do HTLV-1 ocorrem porque o vírus possui total controle na regulação de sua transcrição, sendo estes processos coordenados pelas proteínas TAX, também responsável por ativar a transcrição, e pela proteína REX, que assume o papel de suprimir a mesma, sendo este um fator que contribui para a evasão do controle imunológico do hospedeiro. Outra significativa diferença desse vírus com o HIV, que acaba destruindo as células T CD4+ durante a replicação no hospedeiro, é a proliferação da linhagem já infectada e a sobrevivência da célula infectada por um longo período de tempo, através da inibição de apoptose celular, resultando assim na proteção do vírus intracelular<sup>1,3,25</sup>.

A presença da proteína TAX é comumente observada na fase inicial das “sinapses virológicas”. Após esse período de contágio celular no hospedeiro, as concentrações dessa proteína baixam se tornando quase que indetectáveis. Além disso, ainda não se sabe o mecanismo pelo qual esse processo ocorre, mas sabe-se que a função que ela exerce na imortalização e leucemogênese de células T infectadas se mantém durante décadas<sup>22,25</sup>.

A proteína REX é responsável por se ligar ao mRNA através do elemento responsivo ao REX (RxRE) realizando sua função de regulador pós-transcricional do material genético do HTLV-1<sup>22</sup>. Essa ligação ocorre dentro do núcleo e tem como finalidade a retirada do mRNA para o citoplasma, evitando que ocorra mais splicing na fita, fazendo com que haja uma tradução fiel das proteínas estruturais necessárias para a manutenção do vírus. Além disso, a proteína acessória P30II também está associada à ligação do mRNA tax/rex duplamente spliced para regulação do mesmo, porém essa ligação já está condicionada a manter essa fita no nucléolo para que ocorra a baixa expressão dessas proteínas resultando em um período de latência do provirus<sup>3,22,24</sup>. Durante esse processo pode ocorrer a ligação de REX a P30II e o período de latência é interrompido, com a fita mRNA tax/rex retirada do nucléolo para que ocorra a replicação da mesma e de suas proteínas essenciais<sup>22</sup>.

## 2.2. Epidemiologia

O HTLV é endêmico em áreas como Japão, Ilhas Caribenhas, África, América do Sul, algumas regiões da Romênia e Oriente Médio. Acredita-se que a população de infectados seja de pelo menos 20 milhões em todo o mundo<sup>1,4</sup>. O HTLV-1 e HTLV-2 possuem uma abrangência mundial e suas taxas de prevalência variam de 5% a 27%, sendo altos os índices de positividade. A detecção desse vírus ocorre em tipos de populações específicas onde se mantém as práticas de consumo e contatos com carne de caça, principalmente de primatas não humanos, sendo observado a presença do HTLV-1 como mais prevalente (Figura 4)<sup>19</sup>.

A estimativa pode ainda possuir uma taxa de erro muito alta em relação aos dados informados, levando em consideração a quantidade de trabalhos realizados sobre o tema bem como as investigações epidemiológicas realizadas sobre o vírus. Estimasse que esses dados possam ser bem maiores do que as publicações existentes, visto que a maioria dos hospitais e centros médicos não discutem ou abordam a pesquisa do vírus com a real importância que o mesmo possui, fazendo com que a frequência seja subestimada com os casos detectados entre os indivíduos infectados<sup>15</sup>.

No Brasil, o HTLV-1 foi identificado em 1986, por Kitagawa et al., em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande (MS), com soroprevalência de 13%, tendo essa população como característica comum, sua origem de Okinawa, sul do Japão. O país é considerado como um dos maiores em área para disseminação do vírus e de outras infecções<sup>15,26</sup>. Posteriormente, foi descrito que a cidade de Salvador, capital da Bahia, é o mais populoso em termos de indivíduos infectados com o vírus HTLV-1, sua prevalência é de 1,76% do total de indivíduos residentes na cidade<sup>1,26</sup>.

O HTLV-2 acabou se tornando o tipo que está relacionado com o novo mundo, então acaba sendo encontrado mais facilmente nas populações indígenas das Américas. O mesmo foi identificado em 28 comunidades indígenas em países como México, Brasil, Panamá, Colômbia, Venezuela, Argentina e nos Estados Unidos (estados da Flórida e do Novo México)<sup>27</sup>. O HTLV-2 é mais prevalente em populações indígenas do Brasil, sendo frequentes em 33,3% a 57,9% na tribo Kaiapó; 12,2% na tribo Kraho; 0,42% a 15,4% na tribo Tiriyo; 8,1% na tribo Mundukuru e 11,4% na tribo Arara do Laranjal<sup>1</sup>.

No Amazonas, um estudo realizado por Moraes e colaboradores (2017), demonstrou a fragilidade de dados publicados no estado em relação ao HTLV. As publicações utilizadas como base para o estudo são ainda mais distantes em termos de tempo e quantitativo de

população significativa, levando em consideração a fragilidade já abordada em outros estudos quanto a disponibilidade de metodologias únicas e que possuam sensibilidade e especificidade para diagnóstico da doença em centros de diagnósticos desvinculados aos bancos de sangue e grupos de pesquisa específicos. Apesar disso, o estudo foi significativo ao ponto de identificar 0,13% de soroprevalência do HTLV-1/2 em uma população de 87.402 indivíduos positivos através da metodologia ELISA como triagem inicial para o vírus<sup>28</sup>.

Comparado a outros estados do norte como Amapá com 0,71% e Pará com 0,91%, o Amazonas possui baixa prevalência diante desse estudo, sendo que os autores descrevem como resultado de uma contaminação exclusiva do vírus por afinidades populacionais. Ainda sobre o Amazonas, em especial a cidade de Manaus onde o estudo foi realizado, pode-se observar que os indivíduos positivos para HTLV-2 se mantiveram com resultado considerável conforme a literatura relata ser o tipo de vírus interligado a populações e descendentes de indígenas<sup>28</sup>. Outro dado significativo desse estudo foi a comparação entre indivíduos casados com 62,5% em comparação a indivíduos solteiros, com 37,5% de soroprevalência, indicado que tais dados seja confirmado em um quantitativo populacional maior.<sup>26,28</sup>

Entre os doadores de sangue, observou-se que indivíduos regularmente frequentes à doação são menos infectados pelo vírus do que aqueles que foram doar pela primeira vez. Dados de contaminação relacionados a idade e sexo não foram significativos, porém foi observado que indivíduos diagnosticados com idade mais avançada possuíam uma concentração de provirus mais elevada<sup>28</sup>. Diante do referencial demonstrado, se faz necessário mais pesquisa diante do assunto não somente para validação epidemiológica, mas sim para metodologias mais eficazes tanto para diagnósticos quanto para acompanhamento do vírus na população<sup>26,28</sup>.



**Figura 4.** Distribuição mundial de HTLV-1 em áreas endêmicas. Fonte: Gessain A, Cassar O. 2012.

### 2.3. Transmissão

O HTLV pode ser transmitido por via vertical (mãe para bebê), durante a amamentação ou parto, apesar de a contaminação transplacentária ou durante o parto serem consideradas raras. Por isso, o aleitamento materno é considerado um dos principais mecanismos de transmissão entre nutriz e lactente em zonas endêmicas, visto que, quanto mais tempo for realizada a amamentação em caso da mulher apresentar carga proviral da mãe for alta, maiores serão as chances da contaminação<sup>21,29,30</sup>. Principalmente levando em consideração que a sorologia do HTLV não faz parte do pré natal comum ou durante os primeiros meses de vida do recém-nascido, tornando-se uma via de transmissão preocupante<sup>15,29</sup>

A transmissão pode ocorrer também por via sexual, sendo o homem, considerado o maior responsável pela contaminação em relação a mulher. Esses índices aumentam ainda mais quando a transmissão está associada a outras infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) principalmente aquelas que causam úlceras e rupturas da mucosa como exemplo sífilis e herpes simplex do tipo 2<sup>21</sup>.

Outras formas de disseminação do vírus podem incluir a via parenteral, em especial entre usuários de drogas injetáveis que compartilham seringas e agulhas entre si, além da transfusão de sangue e hemocomponentes. Embora seja raro, órgãos transplantados

contaminados com linfócitos T infectados com HTLV-1 também podem ser incluídos nessa lista, visto que são capazes de transmitir ao receptor o vírus, principalmente se levado em consideração o estado da imunidade do paciente que receberá o órgão e a quantidade de linfócitos T que serão recrutados no processo de adaptação do tecido transplantado<sup>3,21</sup>.

Nas áreas onde ocorre a maior disseminação do vírus, os tipos de transmissão vertical e sexual se tornam as vias de disseminação mais acentuadas da infecção por HTLV-1, contudo, a hemotransfusão tem se destacado na infecção entre pacientes por HTLV em populações não endêmicas, principalmente quando esses locais não possuem políticas de triagem que tornam obrigatórias a detecção do vírus por metodologias eficazes<sup>8</sup>. Nessas regiões ainda se tornam preocupantes os casos de contaminação de humanos por primatas não humanos, seja ela pelo consumo da carne, pela exposição dos mesmos através de mordidas do animal bem como qualquer outro contato desses animais infectados e os humanos<sup>8,31</sup>.

No Brasil, com intuito de prevenir casos de transmissão por meio de transfusão de sangue contaminado, foi implementada em 1993, a triagem universal obrigatória de doadores de sangue para HTLV-1 e HTLV-2 através da Portaria nº 1.376 do Ministério da Saúde<sup>1,7</sup>. Posteriormente, com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 220, de 27 de Dezembro de 2006, foi estabelecido a triagem para que se pudesse diminuir os riscos na doação de órgãos e tecidos<sup>1,13</sup>.

#### **2.4. Aspectos Clínicos**

Os casos sintomáticos de ATLL geralmente estão identificados em regiões onde o HTLV-1 se torna endêmico, visto que a patologia se definiu pela proliferação neoplásica de células T CD4+ infectadas<sup>20</sup>. As formas de transmissão associadas ao consumo de carnes de caça, onde se tem os maiores casos em relação a mordida de primatas não humanos, para a vertical, com a mãe infectada passa ao filho o vírus através do aleitamento materno, estes por contraírem o vírus por um período de vida muito longo acabam por se tornar pacientes que provavelmente após sucessivas tentativas do organismo de silenciar a forma clínica do HTLV-1 acabam por apresentar os sintomas da ATLL<sup>31,32</sup>.

A ATLL é caracterizada pela visualização de múltiplas lesões cutâneas, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia e a imunossupressão do paciente contaminado, sendo

caracterizado pelo acometimento de infecções oportunistas. Outro marcador de pacientes diagnosticados com ATLL é a presença de hipercalemia paraneoplásica no momento do diagnóstico. Essa alteração bioquímica está fortemente relacionada à produção elevada de fator de necrose tumoral beta ou a proteína relacionada ao paratormônio<sup>20</sup>.

Acredita-se que o período de latência do vírus até o início das manifestações clínicas possa perdurar de 40 a 60 anos no indivíduo infectado, entre os motivos pelos quais observa-se esse período de latência, está a imunidade do hospedeiro, a contaminação associada a outras doenças, bem como o período com o qual o vírus leva para ser transmitido a um grande quantitativo de células, envolvidos nesse ciclo temos também os meios de regulação com os quais o vírus irá realizar a contaminação dos reservatórios celulares<sup>22,33</sup>.

Anualmente, são estimados 3.000 novos casos de ATLL, diagnosticados no mundo, levando em consideração que os estudos epidemiológicos aconteçam com maior frequência nas regiões já citadas, esses números se mantêm por conta dos altos índices de casos sintomáticos, porém isso deixa uma margem desenfreada para que ocorra a disseminação entre humanos de forma assintomática, elevando silenciosamente a quantidade de indivíduos portadores do vírus. A quebra da fragilidade de pesquisas em outros grupos ou regiões pode mudar essa visão epidemiológica<sup>32,34</sup>.

A forma oncogênica do vírus se dá principalmente pela interação da sua proteína transativadora viral TAX às vias importantes para sobrevivência celular e apoptose como, por exemplo, os processos autofágicos das células. Muitas vezes, as células ATLL perdem a expressão dessa oncoproteína, porém, acabam por adquirir a capacidade de ativar essas vias que se tornam responsáveis pela sua proliferação celular. Além disso, ocorre a interação sem a presença da oncoproteína, no entanto, os eventos epigenéticos secundários e mutações na via do receptor de células T podem acabar auxiliando na proliferação clonal, que se torna característica como um dos quatro subtipos da doença, sendo classificados como aguda, linfomatosa, crônica e latente<sup>32,33</sup>.

A “classificação de Shimoyama” quanto ao grau de intensidade da patologia causada pelo HTLV-1 foi adotada segundo o estudo do grupo de oncologia clínica do Japão no ano de 1991, resultado de um estudo realizado nos anos de 1983-1987 com base nos prognósticos de vários pacientes inscritos em estudos realizados nesse período<sup>20,34</sup>. A apresentação aguda da doença é a mais comum dentre as subclassificações de ATLL, sendo responsáveis por 55%

dos casos, as características clínicas desse grupo incluem: lesões cutâneas, dores ósseas relacionadas à hipercalcemia, lesões ósseas líticas e infiltrados pulmonares que podem ser visualizadas na imagem do tórax<sup>35,36</sup>. O grau linfomatoso é composto por 20% dos casos podendo haver lesões cutâneas, linfadenopatia maciça e esplenomegalia com ausência de células neoplásicas circulantes, em descrição de casos mais graves com lesão renal e distúrbios neuropsiquiátricos<sup>36</sup>. O subtipo crônico ocorre em mais de 20% de indivíduos sintomáticos e possui o quadro da doença mais indolente sendo que a sobrevida desse estágio pode chegar a 2 anos. A forma latente está condicionada a 5% dos infectados, as lesões cutâneas dessa fase são frequentes, porém, sua intensidade é bem menor do que comparada com a fase aguda. As características respiratórias e gastrointestinais são ausentes e para a confirmação deste estágio é necessário a constatação de apenas 5% das células T CD4+ infectadas no sangue periférico, visto que sua sobrevida sem tratamento pode durar em média 3anos<sup>34-36</sup>.

No decorrer dos anos a medicina tem avançado bastante em relação ao tratamento de pacientes com ATLL, pois se acreditava que a sobrevida de pacientes com o tipo latente apontada no relatório de 1991, que era pouco mais de 4anos fosse maior atualmente<sup>20,33</sup>. No entanto, estes resultados se mostraram contraditórios, pois segundo os relatórios e levantamentos realizados nos anos de 2000-2009 sobre 1.594 pacientes, foi mostrado que a sobrevida em casos de pacientes do tipo latente foi menor que no ano de 1991, apesar de o mesmo relatório apontar que indivíduos com o tipo agudo apresentaram uma melhora em comparação com o último levantamento<sup>34</sup>. Assim, o tipo mais comum e que possui um prognóstico ruim, além da sobrevida deste tipo, latente, é de apenas 4 a 6meses, mesmo com a melhora segundo o relatório ainda se mantém como o tipo mais insatisfatório<sup>33,34</sup>.

A população infectada pelo vírus do tipo 1 ainda pode apresentar outro quadro sintomático, que caracteriza a forma neurodegenerativa da infecção, com aproximadamente 0,3-3% destes desenvolvendo a chamada mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)<sup>37</sup>. Embora a amamentação seja associada muitas vezes à ATLL, as vias de transmissão sexual e parenteral, com o compartilhamento ou acidentes com objetos perfurocortantes, além das transfusões de sangue, bem como os transplantes de tecidos infectados, estão associadas ao surgimento da HAM/TSP, não sendo uma

exclusividade desses meios de transmissão, podem ocorrer nas outras vias o surgimento de HAM/TSP<sup>31</sup>.

A principal forma clínica neuropatológica desta patologia é a meningomielite crônica da substância branca e cinzenta do sistema nervoso central, que geralmente está acompanhada por degeneração axonal, que acomete principalmente o funículo lateral da medula espinhal, além da região médio inferior torácica<sup>37</sup>. Os primeiros sinais das agressões desmielinizantes que um indivíduo que possui HAM/TSP apresenta são dificuldades na marcha, tropeço, dor nas costas, fraqueza dos membros inferiores, tendência a cair e disfunção sexual, geralmente pode-se apresentar como casos isolados ou algumas vezes estendem-se durante semanas, com sintomas que podem perdurar durante anos até que o indivíduo desenvolva realmente a forma grave da doença<sup>31</sup>.

Os sintomas mais frequentes da HAM/TSP, quando o sítio principal de acometimento dos linfócitos provírus é a medula espinhal, são a paraparesia espástica, disfunção neurogênica da bexiga e do intestino e distúrbios sensoriais nos membros inferiores<sup>35,36</sup>. Dentro do grupo de pacientes que são acometidos com HAM/TSP, 90% destes acabam por desenvolver disfunção vesical neurogênica, caracterizados por sintomas de armazenamento (noctúria, urgência e incontinência urinária, além do aumento da frequência urinária), geralmente esses pacientes acabam por exigir que seja realizado cateterismo urinário, porém este procedimento muitas das vezes acaba tendo um sentido duplo em relação ao indivíduo, visto que pode aliviar os sintomas do descontrole urinário, mas pode prejudicar bastante a qualidade de vida dos infectados<sup>36,37</sup>.

Os sexos masculinos e femininos também estão praticamente definidos quanto ao acometimento dos tipos de patologia, pois se observa que o sexo masculino é mais acometido pela ATLL, enquanto há mais mulheres susceptíveis ao grupo neurodegenerativo da doença, essas duas tendências estão vinculadas também ao modo de transmissão da doença, pois a ATLL está vinculada a forma de transmissão vertical e HAM/TSP está associada com transfusões sanguíneas ou outras formas, mesmo porque a idade com a qual o indivíduo é infectado também já foi reportada como um fator de importância para a variação da patologia adquirida pós-infecção<sup>20,38</sup>.

## 2.5. Diagnóstico

O Japão foi o primeiro país a realizar a triagem sorológica para HTLV em 1986, enquanto outros países identificados como foco de disseminação do vírus começaram a adotar os testes para diagnóstico do vírus posteriormente. Países onde o vírus não possui tanta relevância de transmissão, pouco se discute sobre a implementação de programas que façam investigação epidemiológica da infecção na população, levando em consideração o custo/benefício que o teste iria trazer aos centros de diagnóstico<sup>8</sup>.

No Brasil, a triagem para HTLV se tornou obrigatória nos hemocentros em 1993, e desde então o processo vem tomando várias adaptações para que os processos sejam melhorados<sup>28</sup>. No estado de Minas Gerais, foi promulgada a lei 17.344, que torna obrigatória a realização de testes sorológicos para detecção de HTLV, bem como o tratamento do paciente diagnosticado, sendo que após os diagnósticos serem encaminhados a acompanhamento clínico para visualização da progressão ou não da infecção<sup>1,28</sup>.

O Ministério da Saúde preconiza que o diagnóstico de HTLV seja realizado em duas etapas, onde a primeira, considerada de triagem, consiste na realização de ensaio sorológico para detecção do contato com o vírus, sem a discriminação de qual tipo de HTLV o indivíduo está infectado. Os resultados que se mostrarem reativos, devem ser submetidos a repetição dessa fase, sendo ela por ELISA ou CLIA, assim, mantendo a reação, estas amostras serão encaminhadas para a realização de testes mais sensíveis e específicos para confirmação e distinção do tipo de vírus que a amostra contém<sup>1,28</sup>. Nessa segunda fase, considerada confirmatória, além dos ensaios sorológicos, também são realizados testes moleculares, sendo assim, nos hemocentros brasileiros seguindo normas da ANVISA, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 153, de 14 de julho de 2004, emprega-se como teste de triagem sorológica para HTLV-1 e HTLV-2 o teste de ELISA e como teste confirmatório o Western Blot<sup>1,9</sup>.

Atualmente é utilizado nas rotinas de laboratório dos hemocentros o teste de quimioluminescência (CLIA). Essa metodologia tem se mostrado simples, rápida, sensível e específica para a rotina de triagem da detecção de anticorpos contra o vírus HTLV-1/2, desenvolvida por Kamihira et al. (1992), o ensaio imunológico baseia-se na detecção qualitativa de anticorpos contra o vírus através da combinação da amostra e do diluente do ensaio, a reação está baseada na criação de uma área onde será depositada uma parte da amostra tratada previamente e de micropartículas paramagnéticas revestidas com antígenos do

HTLV-1/2<sup>39</sup>. Os anticorpos anti-HTLV contidos na amostra de pacientes infectados irão se ligar à micropartículas revestidas de peptídeo sintético de HTLV-1/2 o antígeno recombinante do HTLV-1, sendo realizada posteriormente a lavagem, para retirada do material que não fez a ligação antígeno-anticorpo. Posteriormente, será adicionado um conjugado marcado com acridínio que irão se ligar aos anticorpos anti-HTLV-1/2, seguindo o ciclo de lavagem, a solução pré-ativadora é adicionada à mistura da reação e o resultado quimioluminescente dessa metodologia é medida em unidades de luz relativa (ULR)<sup>1,30,39</sup>.

Na etapa confirmatória do diagnóstico, pode ser utilizada a técnica de Western Blot (WB), pois se sabe que a infecção das células no hospedeiro acontece pelo contato célula-célula de células contaminadas com o vírus (provírus) com células sadias do hospedeiro, sendo assim, o vírus não pode ser detectado livremente no soro ou plasma<sup>8</sup>, o ensaio realizado para a detecção da infecção pelo HTLV por meio do WB baseia-se na visualização, através dos ensaios imunológicos, de anticorpos específicos para as proteínas virais tanto da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo (p19, p24, p15) quanto do envelope (gp46 e p21), a metodologia acontece então pela reação de ligação entre os anticorpos contra o vírus contidos na amostra do indivíduo contaminado e o peptídeo sintético presente na membrana do teste<sup>1,11</sup>.

O teste adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como padrão para diagnóstico é o WB, apesar de suas limitações. A OMS adota que uma amostra seja considerada reativa quando for identificada uma proteína da região gag (p19 e/ou p24) e duas proteínas do envelope viral (gp46 I ou II e gp21)<sup>1</sup>, diante dessas condições alguns testes podem ser positivos no WB, porém, podem ser não conclusivos quanto ao tipo 1 ou 2 do vírus, sendo consideradas amostras “positivo não tipado”, outra situação considerada é quando há reação de uma das proteínas, mas a amostra não completa o critério de reatividade adotado, este resultado é considerado “indeterminado”<sup>40</sup>, algumas vezes ocorre essa indeterminação por reatividades cruzadas devido a período de soroconversão do próprio HTLV, outras contaminações virais ou parasitárias, como no caso da reatividade a proteínas do *plasmodium falciparum* que pode ocasionar competitividade sorológica no teste à algumas proteínas da região gag, mas nenhuma da região env, que acaba atingindo também outros testes como CLIA e ELISA, sendo necessários ajustes como lisados de *P. falciparum* para inibir essa reatividade em alguns testes<sup>14</sup>. Para detecção de HAM/TSP é necessário que seja

diagnosticado a presença de provírus anti-HTLV-1 no líquido cefalorraquidiano, caracterizando assim o acometimento do sistema nervoso central<sup>31</sup>.

Diante dessas limitações é necessário que seja realizado mais testes moleculares para que o diagnóstico se torne o mais conclusivo possível. Nessas condições, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem se tornado o teste mais indicado para a determinação do provírus na amostra analisada, bem como análises de genes que pudessem ser utilizados como biomarcadores para o vírus<sup>41</sup>.

A PCR é considerada imprescindível nessas situações, por permitir elucidar muitas vezes situações como positivos não tipados e indeterminados, além de se mostrar bastante eficaz durante o período de exposição e soroconversão, a mesma também é utilizada no diagnóstico durante a transmissão vertical e em crianças de até dois anos, onde os testes sorológicos não são considerados devido a transmissão de anticorpos maternos<sup>41</sup>. Recentemente foi idealizado na china por Huimin et al. (2023), o desenvolvimento de um PCR duplex em tempo real para realização de diagnóstico e distinção específica de HTLV em residentes visto que o país é endêmico para o vírus e os custos com as metodologias convencionais para o diagnóstico são altos, a metodologia já foi padronizada e obteve bons resultados para uso<sup>42</sup>.

No Brasil, o Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB), do Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), desenvolveu a metodologia FC-duplex utilizando a citometria de fluxo para análise de amostras contaminadas com o vírus para identificação e distinção de HTLV, a metodologia consiste no uso de cultivos celulares de células comerciais infectadas com o vírus (MT2 e MoT) que após esse processo e preparação das mesmas, acabam se tornando a base no processo de conjugação com a amostra de pacientes para a pesquisa de provírus em indivíduos contaminados, o processo demonstrou bom desempenho para diagnóstico sendo comparada às metodologias convencionais como CLIA, WB, PCR e ELISA, com patente depositada a metodologia se encontra em fase de validação, para assegurar que a mesma possa ser utilizada em grande escala em centros de diagnósticos e grupos de pesquisa<sup>1</sup>. Anteriormente o grupo de pesquisa havia desenvolvido metodologia de suporte qualitativo para o diagnóstico de HTLV-1/2 que utiliza apenas a MT2 como base para reação em amostra contaminada para identificação do vírus, o FC-Simplex também utiliza a citometria de fluxo como aparelho responsável pela leitura das amostras

onde emitem URL responsáveis por sinalizar as amostras que possuem provírus de HTLV, também padronizada e patenteada a metodologia mostrou acurácia suficiente para identificar pacientes assintomáticos e sintomáticos durante os testes realizados, porém não fazia a distinção entre os tipos virais, que foi aperfeiçoado na nova metodologia o FC-duplex HTLV-1/2 IgG1<sup>43</sup>.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Estimar a incidência de HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue do Amazonas comparando diferentes métodos de diagnóstico.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Realizar levantamento sociodemográfico e clínico de candidatos à doação de sangue do Amazonas com sorologia positiva para HTLV-1/2;
- Diferenciar a infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em candidatos à doação de sangue do Amazonas utilizando diferentes métodos de diagnóstico;
- Avaliar o índice de concordância e acurácia de um novo método de diagnóstico baseado na técnica de citometria de fluxo (FC-Duplex HTLV-1/2 IgG1) em amostras de candidatos à doação de sangue do Amazonas com sorologia positiva para HTLV-1/2.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Local de realização da pesquisa**

As amostras utilizadas no estudo foram provenientes de indivíduos candidatos a doação de sangue na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Embora o Hemocentro esteja localizado na cidade de Manaus, é responsável pelo processo de coleta, triagem e distribuição de sangue do Estado do Amazonas.

#### **4.2. Modelo e População do estudo**

Um estudo prospectivo, para verificar a incidência da infecção pelo HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue do Amazonas, comparando diferentes métodos de diagnóstico foi realizado utilizando uma amostragem de conveniência, proveniente de candidatos a doação de sangue voluntários que testaram positivo na CLIA para HTLV-1/2, atendidos na Fundação HEMOAM.

### **4.3. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa**

Os critérios de inclusão utilizados foram: indivíduos de ambos os sexos, voluntários a doação de sangue na região norte do Brasil; admitidos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia da Fundação HEMOAM, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2022; maiores de 18 anos; de ambos os sexos, com teste CLIA positivo para o vírus HTLV-1/2; e mediante aceitação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídos os doadores com material biológico insuficiente e/ou sem amostras para a realização de todos os métodos.

### **4.4. Aspectos éticos**

O presente estudo fez parte de um projeto maior intitulado: “Utilização do FC-DUPLEX HTLV-1/2 IgG1 para Diagnóstico Sorológico Diferencial da Infecção Humana pelo HTLV-1 e HTLV-2 em Candidatos à Doação de Sangue” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de acordo com CAEE: 57153922.5.0000.0009 e número de parecer: 5.348.608.

### **4.5. Garantias éticas aos participantes da pesquisa**

A participação neste estudo foi totalmente voluntária e a recusa ocorreu em qualquer momento e sem qualquer penalidade. Dos participantes, foram coletados os dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais, para elaboração do banco de dados. As informações podem ser consultadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM e equipe de pesquisadores envolvidos. Ademais, a identidade do participante não foi revelada em publicações. Os registros do prontuário também são confidenciais e, sob a responsabilidade do Hospital.

### **4.6. Contato com os indivíduos positivos para HTLV pelo CLIA**

Os candidatos à doação de sangue com sorologia positiva para HTLV na Fundação HEMOAM, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2022, foram contatados via telefone / e-mail pela equipe do Serviço Social e/ou equipe do projeto para participação no estudo. A lista com os dados telefônicos / e-mail dos prováveis participantes foram obtidos no Departamento de Sistemas, via HEMOSYS.

#### **4.7. Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais**

Caso o candidato à doação de sangue com sorologia positiva para HTLV aceitasse participar do estudo, foram coletados os dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais a partir de registros do laboratório de sorologia e de prontuários da Fundação HEMOAM, através do Setor de Atendimento Médico e Estatístico (SAME).

#### **4.8. Obtenção das amostras**

Foram coletados 10 mL de sangue periférico utilizando o sistema de vácuo em tubos com separador de gel (BD gel SST® Advance® II) e PPT (Tube picker K2 EDTA plasma, BD Vacutainer™®) para teste sorológico completo, incluindo HTLV. Foram realizados os exames de triagem por quimioluminescência (CLIA) que detectam anticorpos contra o HTLV-1 e HTLV-2, porém ao serem usados em população de baixo risco como candidatos à doação de sangue, o valor preditivo positivo pode ser muito baixo, sendo necessária a confirmação do resultado por meio dos ensaios confirmatórios de WB. Aqueles que apresentaram WB positiva para HTLV-1/2 foram encaminhados ao serviço de hematologia para acompanhamento pela equipe médica da Fundação HEMOAM. As amostras foram processadas e os testes realizados na Fundação HEMOAM e FIOCRUZ-Minas.

#### **4.9. Quimioluminescência com o kit Alinity's HTLV-1/2:**

A metodologia de quimioluminescência (CLIA) foi realizada no setor de sorologia da Fundação HEMOAM como etapa de triagem para identificação de doadores positivos para o vírus. O procedimento consiste em um imunoensaio de duas etapas para a detecção qualitativa de anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 em soro ou plasma, usando tecnologia de imunoensaio de micropartícula quimioluminescentes, sendo realizado no equipamento Alinity i-SCM 02 Ai01767 (ABBOTT) com sistema fechado. Amostra, micropartículas paramagnéticas revestidas com HTLV-1 e HTLV-2 e diluente de ensaio foram combinados e incubados. Os

anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 presentes na amostra ligam-se aos peptídeos sintéticos de HTLV-1 e HTLV-2 e micropartículas revestidas de antígeno recombinante de HTLV-2. A mistura é lavada. Peptídeos sintéticos de HTLV-1 e HTLV-2 e conjugado de antígeno recombinante de HTLV-1 foram marcados com acridínio para criar uma mistura de reação e incubados. Após um ciclo de lavagem, foram adicionadas as soluções de pré-início e início. A reação quimioluminescente resultante é medida como unidades de luz relativa (URL). Existe uma relação direta entre a quantidade de anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 na amostra e o URL detectado pela ótica do sistema. A presença ou ausência de anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 na amostra é determinada comparando o URL quimioluminescente na reação com o URL de corte determinado a partir de uma calibração ativa.

#### **4.10. Western Blot com o kit MP Diagnósticos Blot 2.4 HTLV-1/2:**

O Western Blot (WB) é um imunoenensaio enzimático em tiras que utiliza antígenos definidos derivados de proteínas do HTLV-1 e HTLV-2, utilizado como metodologia de etapa confirmatória capaz de detectar e distinguir entre os tipos do vírus 1 e 2. Os antígenos utilizados são proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos purificados e fixados numa membrana de nylon. A antigenicidade exibida por estas proteínas e peptídeos é comum aos anticorpos do HTLV-1 e HTLV-2 ou específica do tipo de um dos dois vírus, e permite realizar a confirmação e discriminação destes na amostra analisada. Foram aplicadas duas bandas gag (p19 I/II, p24 I/II) e duas bandas env (gp46 I/II, gp21 I/II) como antígenos sem especificidade de tipo, que são utilizados para confirmar a presença de anticorpos contra HTLV-1/2. Os antígenos de tipo especificados para HTLV-1 (gag p19-I, env gp46-I) e HTLV-2 (env gp46-II) são aplicados para diferenciar entre as infecções HTLV-1 e HTLV-2. A amostra a testar pode ser plasma provenientes de coletas com tubos contendo anticoagulante EDTA, citrato ou heparina, ou soro. As amostras foram previamente centrifugadas para separação celular. Para a realização do teste foi necessária uma fita do kit impregnada com antígenos de HTLV-1/2 que ficou em uma calha, submersa em 1mL de solução diluente contendo 10µL de amostra homogeneizados, foi certificado de que a calha era suficiente para não derramar a solução diluente/amostra para fora da mesma, a fita ficou totalmente submersa na solução e com as linhas da membrana viradas para cima. As amostras foram incubadas, colocadas em suporte num agitador ou oscilador, e homogeneizadas por duas horas à temperatura ambiente (de 18 - 25°C). Em seguida foi removido cuidadosamente

o líquido, as tiras foram lavadas 3 vezes (5 minutos) com 1 mL de solução de lavagem do kit. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de solução de conjugado, fornecido do kit, em cada cavidade de teste, incubado com o conjugado e colocado o suporte de teste no agitador ou oscilador por 30 minutos à temperatura ambiente (de 18 - 25°C). Em seguida, as tiras foram lavadas 3 vezes (5 minutos) com 1 mL de solução de lavagem (do kit) e adicionado 1 mL de solução de substrato (do kit) a cada cavidade de teste, incubado com o substrato, colocado o suporte de teste no agitador ou oscilador, e agitou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente (de 18 - 25°C). Ao final, o líquido foi aspirado e adicionado 1 mL de solução de parada (do kit) a cada cavidade, seguido de incubação com a solução de paragem, colocado o suporte no agitador ou oscilador, durante 10 - 30 minutos à temperatura ambiente (de 18 - 25°C). Posteriormente, as tiras foram retiradas das cavidades de teste e colocadas com o lado da membrana virado para cima, sobre papel absorvente com o auxílio de uma pinça. Quando as tiras secaram completamente, e foram analisados os resultados. Para acelerar o processo de secagem, colocou-se as tiras numa estufa a 37°C durante 30 minutos. As tiras processadas mantêm a cor desde que sejam conservadas num local escuro. Quando a amostra não contém anticorpos específicos de HTLV, se desenvolve uma ligeira cor de fundo, como observado nas linhas de controle que foram impregnadas na membrana para verificação da qualidade do teste.

#### **4.11. FC-Duplex HTLV-1/2 IgG1**

O Ensaio FC-Duplex é dividido em 3 etapas, que consistem no **1) Preparo dos suportes antigênicos com as células MT-2 e MoT**: linhagens comerciais de células já infectadas com o vírus HTLV. Brevemente, as células foram semeadas em garrafas de cultura de tecido de 75cm<sup>2</sup>, com meio RPMI-20% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade por 72h para favorecer o crescimento das células. Após esse tempo, a suspensão foi coletada da garrafa em fase log de crescimento, homogeneizada e centrifugada a 1.200 rpm, por 10 min., para a eliminação dos grumos celulares. As células não agregadas foram lavadas com PBS suplementado com 0,5% de SBF por meio de centrifugação a 1.200 rpm por 10 min. em tubos cônicos de 50mL. A suspensão celular foi então fixada por ressuspensão em solução fixadora para citometria de fluxo (10,0g/L de paraformaldeído, 10,2 g/L de cacodilato de sódio e 6,65 g/L de cloreto de sódio pH7,2). O quantitativo de células da suspensão foi ajustado para 1,0 x 10<sup>6</sup>/mL em PBS-0,5% SBF; **2)**

**Marcação diferencial das linhagens celulares:**foi realizada uma marcação fluorescente diferencial com o fluorocromo AlexaFluor 647 com diferentes concentrações, sendo as concentrações de 0.002 $\mu$ g/mL para a MT-2 e 0.04 $\mu$ g/mL para MoT, definidas como as melhores para diferenciar uma linhagem celular da outra quanto à intensidade média de fluorescência (IMF); **3) Pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo:** Para a pesquisa dos anticorpos IgG1 anti-HTLV-1 e 2 as alíquotas de soro/plasma foram descongeladas, diluídas em PBS (0,15M pH 7,2, 8,0 g/L de NaCl, 2,0 g/L de KCl, 2,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,15 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) suplementado com 3% de SBF, centrifugadas a 4°C, 14.000 rpm por 5min e os sobrenadantes foram armazenados em geladeira até o uso. Em placas de 96 poços com fundo em “U” foram adicionados 50 $\mu$ L do soro/plasma diluído em PBS-3% SBF e 50 $\mu$ L da suspensão de células previamente fixada (1 x 10<sup>6</sup> células/mL – MT-2 e MoT), conforme padronização do GIPB. A mistura foi incubada a 37°C por 30min, lavada com 150 $\mu$ L de PBS-3% SBF por centrifugação (4°C, 1.300 rpm por 10min) e o sobrenadante desprezado. Para a pesquisa de anticorpos IgG1, a cada poço da placa foram adicionados 50 $\mu$ L de anticorpo anti-IgG1 humano biotilado diluído em PBS-3% SBF e 10 $\mu$ L de SAPE diluída em PBS-2% de soro albumina bovina. A mistura foi incubada a 37°C por 30min. Após incubação, as células foram lavadas 1 vez como descrito acima e o sobrenadante desprezado. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo FACSCalibur BD da Fundação HEMOAM e/ou FIOCRUZ-Minas e análise dos dados realizada com o Software FlowJo v10.1, conforme descrito previamente<sup>1,43</sup>.

#### **4.12. Análise dos dados:**

Os dados clínicos e sociodemográficos dos participantes do estudo foram apresentados em formas de tabelas e/ou gráficos, elaborados no programa Microsoft Excel. Os resultados adquiridos na imunofenotipagem foram obtidos e analisados através do software FlowJo (v10.1). Para elaboração das análises descritivas e estatísticas convencionais foi utilizado o software GraphPad Prism 8.1. Inicialmente foram realizados testes para verificar normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk. As comparações de valores entre dois grupos de dados foram realizadas com os testes T student ou Mann-Whitney, enquanto para as comparações das variáveis com três ou mais grupos, foi realizada por meio dos testes ANOVA One-way ou Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Tukey ou Dunn's, para

múltiplas comparações entre os grupos. A significância estatística considerada em todos os casos foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto dessa dissertação será apresentado no formato de artigo a ser submetido à revista *Journal of Immunological Methods*.

### **Deteção da Infecção por HTLV-1/2 em Doadores de Sangue do Amazonas: Avaliação de Diferentes Ensaio Imunológicos**

**Felipe Araujo Santos<sup>1,2</sup>; Cláudio Lucas Santos Catão<sup>1,2</sup>; Júlia Pereira Martins<sup>3,4</sup>; Uzamôr Henrique Soares Pessoa<sup>2</sup>; Isabelle Vasconcelos Sousa<sup>2,5</sup>; Fábio Magalhães-Gama<sup>2,3,4</sup>; Jean Silva Melo<sup>6,7</sup>; Gláucia Lima de Souza<sup>1,2</sup>; Nilberto Dias de Araújo<sup>1,2,6</sup>; Cláudia Maria de Moura Abraham<sup>2</sup>; Antônio Carlos Rosário Vallinoto<sup>8</sup>; Gemilson Soares Pontes<sup>1,6,7</sup>; Márcio Sobreira Silva Araújo<sup>3,4</sup>; Olindo Assis Martins-Filho<sup>3,4</sup> & Allyson Guimarães da Costa<sup>1,2,5,6\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil;

<sup>2</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>4</sup>Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou - FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brazil.

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil;

<sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, UFAM, Manaus, Brazil;

<sup>7</sup>Laboratório de Virologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil,

<sup>8</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes infecciosos e Parasitários, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brasil;

**\*Correspondence:** Rua Terezina, 495, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, Brazil, Zip code: 69057-070. Phone: +55 92 98153-5233, E-mail: allyson.gui.costa@gmail.com

## RESUMO

Ovírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 e 2 (HTLV-1/2) são retrovírus oncogênicos que causa uma *lifelonginfection*. Estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas estejam infectada sem todo o mundo, um número que provavelmente é maior devido à falta de dados epidemiológicos confiáveis. Atualmente existe uma escassez de métodos diagnósticos capazes de distinguir anticorpos gerados pelo HTLV-1/2. Além disso, a sensibilidade/especificidade, a necessidade da utilização paralela de outros ensaios imunológicos e/ou moleculares (Western Blot e RT-PCR), além do custo elevado dos testes disponíveis comercialmente para o diagnóstico diferencial da infecção, representa um dos grandes desafios em estudos sobre o HTLV. Nesse contexto, avaliamos a detecção da infecção por HTLV-1/2 por diferentes ensaios imunológicos, em candidatos a doação de sangue em um hemocentro brasileiro com baixa soroprevalência. Nossos resultados demonstraram uma prevalência de 0.15% de indivíduos reativos para HTLV no período do estudo. A metodologia de ensaio quimioluminescente (CLIA) apresentou excelente desempenho como etapa de triagem, exibindo sensibilidade de 100% na reatividade para o vírus. Embora os dados de acurácia (62.4%) não sejam animadores, observamos que outro ensaio, o FC-Simplex, apresentou melhor desempenho (acurácia = 91.5%) para o diagnóstico da infecção. Adicionalmente, a extensão desse ensaio, o FC-Duplex, apresentou concordância de 100% com os resultados obtidos pelo método padrão-ouro estabelecido no estudo (Western Blot) para distinção entre HTLV-1 e 2. Coletivamente, os ensaios imunológicos avaliados apresentaram bons resultados, e as novas metodologias demonstraram ser promissoras para confirmação do diagnóstico e identificação do tipo de vírus causador da infecção após os testes de triagem.

**Keywords:** HTLV Universal diagnosis HTLV differential diagnosis, chemiluminescent immunoassay, western blot, flow cytometry.

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrófico de células T humanas (HTLV) é um retrovírus oncogênico descoberto em 1980, com 4 tipos descritos (HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4). O HTLV-1 e HTLV-2 são vírus considerados de importância médica, estando relacionados a Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), doenças neurodegenerativas, tais como Mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) e Paraparesia espástica tropical (TSP), além de infecções de células pilosas (Gessain and Cassar, 2012; Mahieux and Gessain, 2011; Roucoux and Murphy, 2004). Estima-se que 3 a 5% das infecções por HTLV-1 possam evoluir para essas patologias, enquanto a infecção por HTLV-2 ainda precisa ser mais bem caracterizada quanto a sua relação com essas condições clínicas (Castro-Costa et al., 2006; Kalyanaraman et al., 1982; Martinez et al., 2019; Takatani et al., 2017; Uchiyama, 1997).

A transmissão do vírus em humanos ocorre através do contato sexual, transfusão de sangue, transplante de órgãos contaminados, amamentação de recém-nascidos e acidentes ou compartilhamento de instrumentos perfurocortantes contaminados (Gross and Thoma-Kress, 2016; Igakura et al., 2003; Martinez et al., 2019; Verdonck et al., 2007). Estima-se que as infecções por HTLV-1/2 afetem aproximadamente 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo, com prevalência variando entre 5% e 27% (Gessain and Cassar, 2012; Willems et al., 2017). Áreas do Japão, Ilhas Caribenhas, África, América do Sul, algumas regiões da Romênia e Oriente Médio são endêmicas para o HTLV-1, enquanto o HTLV-2 é encontrado em pigmeus na América Central, países da África e populações indígenas das Américas (Beilke, 2012; Gessain and Cassar, 2012; Roucoux and Murphy, 2004).

No Brasil, os primeiros casos de HTLV foram detectados em 1986, em uma comunidade de descendentes japoneses no Mato Grosso do Sul (Kitagawa, 1986). Posteriormente, foi descrito a detecção do vírus nas diferentes regiões e estados brasileiros, com maior número de casos nos estados da Bahia, Maranhão e Pará, embora a infecção seja considerada endêmica e com distribuição heterogênea (Carneiro-Proietti et al., 2002; Catalan-Soares et al., 2001). Na região Norte do Brasil, relatórios tem demonstrado alta prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 em doadores de sangue dos Estados do Amapá (0,71%) e Pará (0,91%), embora no Amazonas, o quantitativo de casos seja considerado baixo (0,13%) (Catalan-Soares et al., 2005a; Galvao-Castro et al., 1997; Moraes et al., 2017).

A detecção do HTLV-1/2 é realizada inicialmente com os Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Imunoensaio Quimioluminescente (CLIA) e o ensaio de aglutinação de partículas (PA), para a triagem dos pacientes e doadores de sangue por conta da sua alta sensibilidade. Posteriormente, são realizados os ensaios confirmatórios através do ensaio de Western Blot (WB), imunoensaio de fitas (INNO-LIA) e a reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), visto que possuem alta especificidade para detecção de anticorpos específicos para diferentes antígenos do HTLV, bem como a detecção molecular do material genético do provírus (Moreno et al., 2013; Rosadas et al., 2021). Além disso, um novo método para triagem e diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1/2 baseado na técnica de citometria de fluxo foi proposto, tendo resultados promissores para triagem com o ensaio FC-Simplex IgG1 (HTLV) e diferencial para as infecções por HTLV-1 ou HTLV-2 com o ensaio FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) (Coelho-dos-Reis et al., 2017, 2009; Pimenta de Paiva et al., 2022).

O WB é o ensaio considerado padrão ouro para a detecção e diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2, embora apresente limitações quanto a soroconversão em indivíduos recém-infectados, além dos altos custos, devido à baixa disponibilidade de testes (Campos et al., 2019; Martins et al., 2010; Namen-Lopes et al., 2009). Adicionalmente, é observada a dificuldade de automação desses ensaios, sendo proposto para os centros de doação de sangue o uso do CLIA, visto que possui uma ótima sensibilidade e capacidade de rastrear a infecção, apesar dos resultados falso-positivos (Kiely et al., 2010; Namen-Lopes et al., 2009; Tosswilland Taylor, 2018; Yun et al., 2019a). Assim, nosso estudo realizou a detecção da infecção por HTLV-1/2 em doadores de sangue do Amazonas, Brasil, avaliando a acurácia dos ensaios imunológicos CLIA, WB e FC-Simplex, além do diagnóstico diferencial da infecção por HTLV-1 e HTLV-2 com os ensaios WB e FC-Duplex.

## **2. MATERIAL E METODOS**

### **2.1 Desenho do estudo**

Foi realizado um estudo longitudinal com doadores de sangue do Estado do Amazonas, Brasil, avaliados pela Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), com resultado positivo para infecção por HTLV-1/2 com o ensaio CLIA, no período janeiro de 2018 a dezembro de 2022. O estado do Amazonas possui uma

baixa prevalência para a infecção pelo HTLV-1/2, sendo estimada em 0,13% (Morais et al., 2017).

## **2.2 Declaração ética**

A aprovação ética do estudo foi obtida do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOAM (aprovação número 5.348.608, CAEE: 57153922.5.0000.0009). Todos os procedimentos estão de acordo com a Resolução 466/12 do Ministério da Saúde do Brasil e com a Declaração de Helsinque. Os participantes leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da inscrição.

## **2.3 Características da população de estudo**

Pacientes com 18 anos ou mais apresentando sorologia positiva para o HTLV-1/2 no teste de triagem CLIA. Aqueles que aceitaram assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram submetidos a um novo ensaio CLIA, além dos ensaios WB, FC-Simplex e FC-Duplex. Os resultados dos ensaios imunológicos não foram usados para decisão médica no diagnóstico e tratamento. Além disso, os participantes com resultado positivo para infecção por HTLV-1 ou HTLV-2 pelo ensaio WB, foram considerados com diagnóstico definido.

## **2.4 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais**

Informações sociodemográficas e clínicas foram coletadas por meio de questionário e a partir dos registros do Laboratório de Sorologia com o sistema HEMOSYS. Os dados do HEMOSYS foram atualizados no momento da aplicação do TCLE.

## **2.5 Coleta e Processamento das Amostras Biológicas**

O sangue venoso para os ensaios imunológicos foi coletado utilizando sistema a vácuo em tubos com gel separador (BD gel SST<sup>®</sup> Advance<sup>®</sup> II). Posteriormente, as amostras biológicas foram centrifugadas, e alíquotas de ±700uL foram preparadas e congeladas a -80°C até o momento da realização dos ensaios CLIA, WB, FC-Simplex e FC-Duplex.

## **2.6 Ensaio de Quimioluminescência com o kit Alinity's HTLV-1/2**

O Ensaio de quimioluminescência (CLIA) foi realizado no setor de sorologia da Fundação HEMOAM como etapa de triagem para detecção de doadores positivos para a infecção por HTLV-1/2. O procedimento consiste em um imunoensaio de duas etapas para a detecção qualitativa de anticorpos para HTLV-1 e HTLV-2 em soro, usando o kit Alinity's HTLV-I/II (Abbott<sup>®</sup>). O imunoensaio é realizado com sistema fechado e tecnologia

de micropartículas quimioluminescentes no equipamento Alinity<sup>si</sup>-SCM 02 Ai01767 (Abbott<sup>®</sup>). Os testes foram realizados seguindo as orientações dos fabricantes do kit e equipamento, com resultados expressos em unidades relativas de luz (URL).

### **2.7 Western Blot com o kit HTLV blot 2.4**

O ensaio de Western Blot(WB), foi realizado com o kit HTLV blot 2.4 (MP diagnostics<sup>®</sup>), seguindo as orientações dos fabricantes do kit e equipamentos que auxiliam no seu desempenho. O imunoenensaio em tira utiliza antígenos definidos e derivados de proteínas do vírus HTLV-1 e HTLV-2, utilizado como metodologia de etapa confirmatória capaz de detectar e distinguir os tipos do vírus 1 e 2, gerando resultados positivos, negativos e indeterminados.

### **2.8 Ensaio de Citometria de Fluxo com o kit FC-Simplex IgG1 (HTLV)**

O ensaio FC-Simplex IgG1 (HTLV) foi desenvolvido como metodologia de suporte qualitativo para a detecção da infecção por HTLV, usando linhagem celular infectada comercial (Coelho-dos-Reis et al., 2017, 2009). A tecnologia emprega um sistema para detecção de anticorpos IgG1 em uma plataforma de imunofluorescência competitiva por citometria de fluxo, usando como suportes antigênicos corados com marcação fluorescentes células MT-2 (Biotina/Estreptavidina), acoplado a um sensor de alta sensibilidade (IgG1) corado com Ficoeritrina (PE). O sistema de detecção das amostras é realizado a partir da aquisição no citômetro FACSCalibur e análise da Intensidade Média de Fluorescência (MFI) com o Software FlowJo (v10.1). Os resultados foram expressos em percentual de células fluorescentes positivas (PPFC). O ensaio tem como objetivo selecionar amostras positivas, mas sem realizar a distinção entre os tipos virais, funcionando como etapa de triagem para o FC-Duplex IgG1 HTLV.

### **2.9 Ensaio de Citometria de Fluxo com o kit FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)**

O ensaio FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) foi desenvolvido como metodologia de suporte para o diagnóstico diferencial da infecção por HTLV-1 e HTLV-2, usando células comerciais infectadas com os vírus (Pimenta de Paiva et al., 2022). A tecnologia emprega um sistema para detecção de anticorpos IgG1 em uma plataforma de imunofluorescência competitiva por citometria de fluxo, usando como suportes antigênicos corados com marcação fluorescentes células MT-2 e MoT (AlexaFluor 647-AF647), acoplado a um sensor de alta sensibilidade (IgG1) corado com Ficoeritrina (PE). Os resultados foram expressos em percentual de células

fluorescentes positivas (PPFC), sendo obtidos com o sistema de detecção após a aquisição das amostras no citômetro FACSCalibur e análise da MFI com o Software FlowJo (v10.1).

### **2.10 Análise de dados**

O Software Prisma GraphPad versão v.8.1 (GraphPad Prism, San Diego, CA, EUA) foi usado para elaboração dos gráficos e análises estatísticas. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição e a normalidade das variáveis, mostrando uma distribuição não paramétrica. A comparação dos dados da URL e PPFC foram realizadas através do teste Mann-Whitney. Os níveis de significância estatística em todas as análises foram definidos com o  $p < 0,05$ . O teste de acurácia foi calculado por um aplicativo online (<https://www.openepi.com/DiagnosticTest/DiagnosticTest.htm>) e software Stata, versão 16.0 (StataCorp LLC, CollegeStation, TX, EUA). A sensibilidade foi calculada como a proporção de participantes com HTLV-1/2 que tiveram um teste WB/CLIA positivo e a especificidade como o número de participantes com resultado negativo no WB/CLIA. O valor preditivo positivo (VPP) foi calculado como a proporção de participantes entre aqueles com resultado WB/CLIA positivo, e o valor preditivo negativo (VPN), como a proporção de participantes com WB/CLIA negativo. Além disso, esse relatório seguiu as recomendações do guia STARD.

## **3. RESULTADOS**

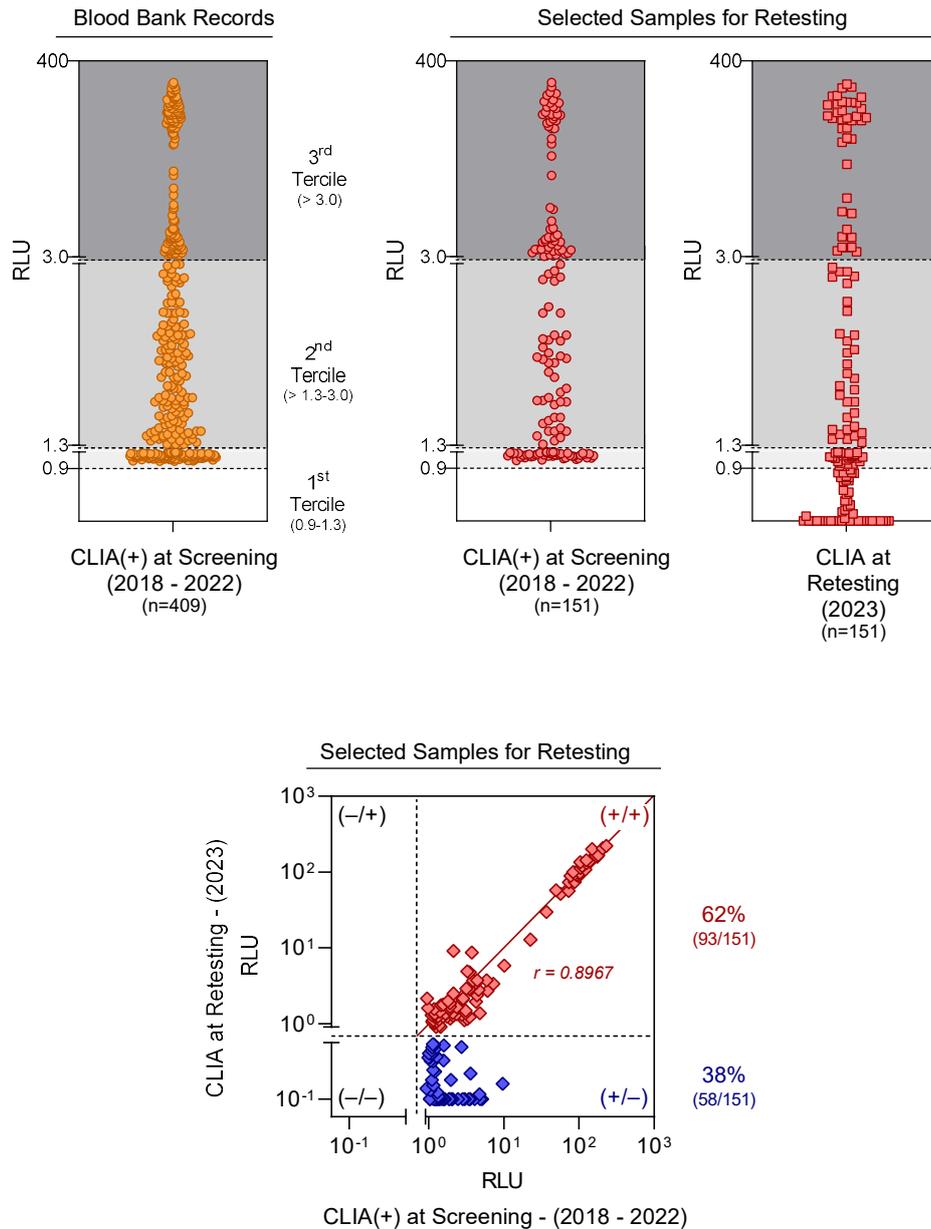
No período de estudo, foram identificados 409 doadores de doação reativos para o vírus HTLV na detecção de triagem, com ensaio CLIA feito pela Fundação HEMOAM. Esse quantitativo equivale a uma prevalência de 0,0015 ou 0,15%, quanto calculamos com o quantitativo de doadores no período ( $n=257.942$ ). A idade mediana foi de 33 anos, com predomínio de doadores do gênero masculino (51%) e mediana da URL de 1.79. Os dados estão demonstrados na Tabela 1 e Figura 1.

**Table 1.** Características laboratorial e epidemiológicas de doadores de sangue incluídos no estudo.

Variáveis	Triagem, doadores de sangue (n = 409)	Reteste, doadores de sangue (n = 151)
<b>Idade</b> , anos (media [IQR])	33 [18-69]	34 [18-61]
<b>Sexo</b>		
Masculino, n (%)	209 (51%)	69 (46%)
Feminino, n (%)	200 (49%)	82 (54%)
<b>CLIA* Resultados</b>		
Positivo, n (%)	409 (100%)	93 (62%)
Negativo, n (%)	-	58 (38%)
URL Positivo, (media [IQR])	1.79 [1.2-4.5]	2.5 [1.3-81.4]
URL Negativo, (media [IQR])	-	0.1 [0.1-0.5]
<b>WB Resultados</b>		
Positivo, n (%)	-	30 (20%)
Negativo, n (%)	-	111 (73%)
Indeterminado, n (%)	-	10 (7%)
<b>FC-Simplex Resultados</b>		
Positivo, n (%)	-	26 (17%)
Negativo, n (%)	-	125 (83%)
Positivo PFFC, (media [IQR])	-	34.8 [28.3-48.1]
Negativo PFFC, (media [IQR])	-	8.5 [6.6-11.8]

\*CLIA: Quimioluminescência; WB: Western Blot; FC-Simplex: FC-Simplex IgG1 (HTLV); RLU: Unidade relative de Luz, PFFC: Porcentagem fluorescente celular positiva.

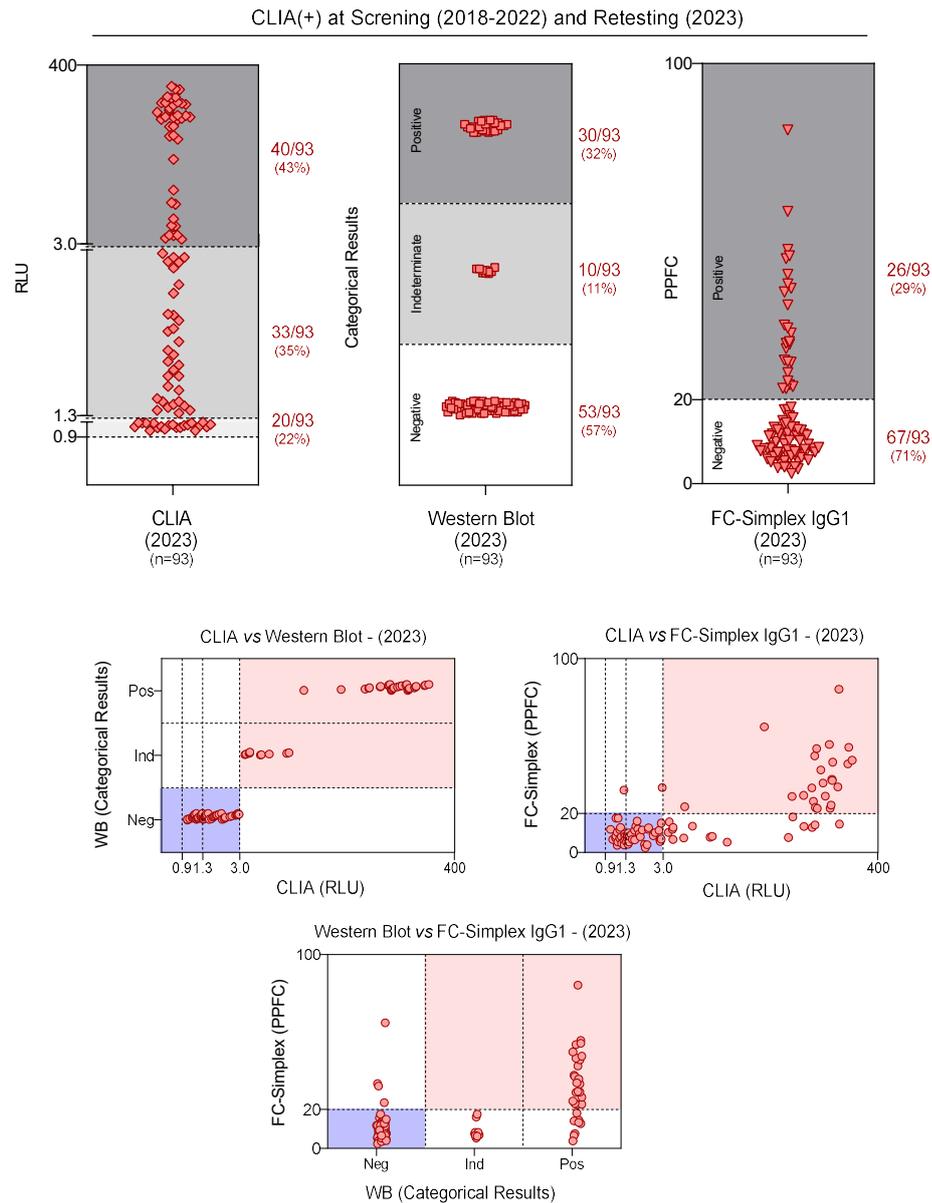
Após a triagem inicial, os doadores foram convidados a retornar para nova coleta de amostras e realização do reteste e demais ensaios imunológicos para detecção da infecção pelo HTLV-1/2, no entanto, apenas 151 doadores foram contactados e tiveram as amostras coletadas, sendo em sua maioria do sexo feminino (54%), com idade mediana de 34 anos (Tabela 1). Ao analisarmos os resultados do reteste CLIA, nota-se que apenas 62% dos doadores foram positivos, com URL mediana de 2.5. Adicionalmente, foi realizado os demais ensaios imunológicos, sendo observado que apenas 30 (20%) doadores tiveram resultado positivo no WB e 26 (17%) tiveram resultado positivo no FC-Simplex (Tabela 1). Em seguida, foi realizada a comparação entre a mediana dos valores de URL obtidos no teste de triagem versus o resultado do reteste, sendo observado uma diminuição significativa ( $p < 0,0001$ ), com correlação de 0,89, conforme observado na Figura 1.



**Figure 1. Avaliação da soroprevalência para HTLV em candidatos a doação de sangue no Hemocentro do estado do Amazonas com o ensaio de Quimioluminescência (CLIA).** (A) Identificação de 409 doadores de sangue inaptos através da metodologia CLIA, entre os anos de 2018 e 2022. Resultados da CLIA dos 151 participantes do estudo no momento da doação de sangue (2018-2022) e no teste de repetição (2023). (B) Comparação da mediana dos valores de URL da CLIA no momento da doação de sangue e no teste de repetição (2023). CLIA, Quimioluminescência; URL, unidades relativas de luz.

Quando se analisou os 93 doadores positivos no reteste do ensaio CLIA, observou-se 3 faixas de positividade, sendo classificada em muito baixa (URL=0.9-1.3) com 22% dos resultados, baixa (URL=>1.3-3.0) com 35% e alta (URL=>3.0-400) com 43%. Ao

categorizarmos esses doadores de acordo com o resultado do WB, observamos que 57% tiveram resultado negativo, 11% resultado indeterminado e 32% resultado positivo. Em seguida, classificamos estes de acordo com os resultados do FC-Simplex, sendo observado que 74% tiveram resultado negativo e 26% resultado positivo (Figura 2).



**Figure 2.** Avaliação dos diferentes ensaios imunológicos na detecção do HTLV. (A) Segregação de amostras negativa, indeterminadas e positivas através das metodologias CLIA, Western Blot e FC-Simplex, conforme os valores dos resultados apresentados em cada ensaio. (B) Comparação dos métodos CLIA vs Western Blot, CLIA vs FC-Simplex IgG1 e Western Blot x FC-Simplex IgG1. PPFC, percentual de células fluorescentes positivas.

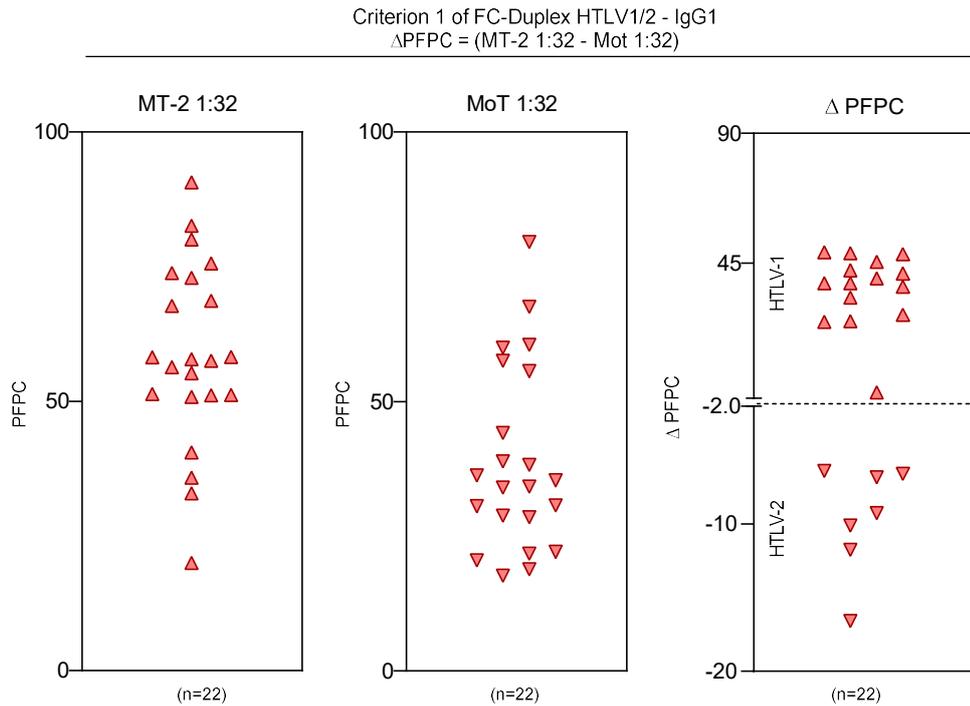
A Figura 2 nos mostra ainda que a faixa muito baixa e baixa no ensaio CLIA (57%) tiveram um resultado negativo no WB (57%). Dados similares foram observados quando se comparou os resultados do ensaio CLIA vs FC-Simplex e WB vs FC-Simplex, com a performance do ensaio FC-Simplex semelhante ao WB, embora se tenha notado alguns resultados falso-positivos e falsos-negativos. Para descrever a acurácia dos ensaios imunológicos para a detecção do HTLV-1/2, realizou-se a análise de performance diagnóstica (Tabela 2). Conforme demonstrado, o ensaio CLIA apresentou baixa acurácia quando comparada ao WB, teste padrão-ouro. Por outro lado, o ensaio FC-Simplex apresentou uma ótima acurácia nesta análise, tendo baixa acurácia quando comparado ensaio CLIA.

**Table 2.** Performance diagnóstica dos ensaios imunológicos para detecção da infecção por HTLV-1/2.

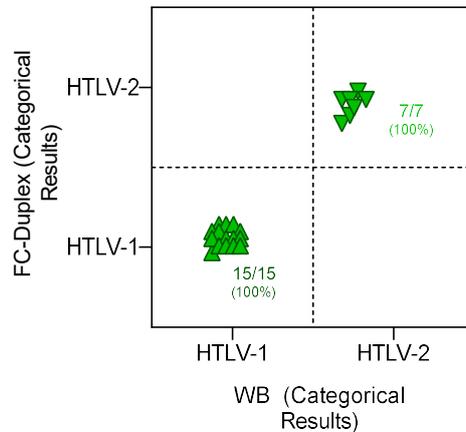
	Acurácia % (CI 95%)	Sensibilidade % (CI 95%)	Especificidade % (CI 95%)	PPV* % (CI95)	NPV % (CI95)
<b>WB<sup>#</sup> vs CLIA (N=141<sup>&amp;</sup>)</b>	62.4 (54.2-70.0)	100 (88.7-100)	52.3 (43.0-61.3)	36.1 (26.6-46.9)	100 (93.8-100)
<b>WB vs FC-Simplex (N=141)</b>	91.5 (85.7-95.1)	73.3 (55.6-85.8)	96.4 (91.1-98.6)	84.6 (66.5-93.9)	93.0 (86.8-96.4)
<b>CLIA vs FC-Simplex (N=151)</b>	55.6 (47.7-63.3)	28.3 (20.1-38.)	98.3 (91.0-99.7)	96.3 (81.7-99.3)	46.8 (38.2-55.5)

\*PPV: Valor preditivo positivo; NPV: Valor preditivo negativo. <sup>#</sup>WB: *Western Blot*; CLIA: *Quimioluminescência*; FC-Simplex: *FC-Simplex IgG1 (HTLV)*. <sup>&</sup>N Amostras indeterminadas no WB foram excluídas.

Por fim, analisamos a capacidade do ensaio FC-Duplex em segregar os doadores de sangue com resultado positivo no WB em HTLV-1 dos HTLV-2, utilizando o critério 1 descrito anteriormente (Pimenta de Paiva et al., 2022). Para essa análise, incluímos 22 amostras e quando avaliamos a distribuição de dispersão de valores individuais obtidos a partir das células MT-2 e MoT, observamos que 15 pacientes tiveram o resultado combinado com o WB em HTLV-1 e 7 em HTLV-2, com uma concordância de 100% (Figura 3). Ao utilizamos os critérios 2 e 3, não obtivemos resultados tão satisfatórios (Figura suplementar 1 e 2).



Western Blot vs FC-Duplex IgG1 - (2023)



**Figure 3. Desempenho do ensaio FC-Duplex IgG1 na distinção em HTLV-1/2 após a etapa de triagem utilizando o Critério 1.** (A) Visualização da reatividade para os tipos HTLV-1 e HTLV-2 nas linhagens MT-2 (1:32) e MoT (1:32), respectivamente, utilizando o Critério 1 do FC-Duplex IgG1. (B) Avaliação da concordância entre os resultados Western Blot vs FC-Duplex HTLV-1/2 IgG1. PPFC, percentual de células fluorescentes positivas.

#### 4. DISCUSSION

Durante os 5 anos de triagem de doadores de sangue reativos para HTLV-1/2 na Fundação HEMOAM, detectamos 409 indivíduos que foram considerados inaptos a doação por sorologia reativa para o vírus, utilizando o ensaio CLIA. No momento da tentativa de doação, esses indivíduos são sinalizados no sistema HEMOSYS com pendências, para serem contatados pelo serviço do banco de sangue, retorno e reteste para confirmação do diagnóstico. Esse procedimento ocorre conforme orientação do Ministério da Saúde e Lei 17.344 promulgada pelo diário oficial da união, que torna obrigatório o diagnóstico e acompanhamentos de indivíduos infectados com HTLV, para que sejam assistidos quanto sua condição sorológica (Rosadas et al., 2021).

Durante o período do estudo (2018 a 2022), identificamos uma prevalência de 0,15% (n= 257.942 doadores aptos no período de estudo). Observamos um discreto crescimento nessa população quando comparamos com dados de levantamentos anteriores realizado na mesma região do Brasil, que identificou uma prevalência 0,13% (n=87.402) no período de 2001 a 2003, e de 0,14% (n=6865) no período de 2008 a 2009, indicando que a prevalência no estado foi mantida (da Motta Passos et al., 2014; Morais et al., 2017). É importante considerar, que o presente estudo apresentou um período maior de levantamento, abrangendo um maior número de doadores, e da mesma forma, foi observado uma baixa prevalência. Esses dados, demonstram que o Amazonas permanece como um dos estados de menor prevalência quando comparado a outros da região Norte do Brasil, como Amapá (0,71%) e Pará (0,91%) (Catalan-Soares et al., 2005b; Ishak et al., 2020).

Apesar da baixa prevalência de doadores de sangue reativos para HTLV na cidade de Manaus, novos estudos devem ser realizados, especialmente considerando outras populações que não sejam de doadores de sangue, tais como ribeirinhos e indígenas. A realização de pesquisas com outras populações de estudo forneceria dados complementares, refletindo em um melhor panorama da prevalência do vírus HTLV no Amazonas. Caso novos levantamentos sejam realizados em doadores de sangue, seria interessante utilizar as mesmas metodologias de ensaios do presente estudo, com a finalidade de uma para comparação mais segura, levando em consideração que ELISA e CLIA podem divergir quanto ao processo de triagem e diagnóstico (Guiraud et al., 2023; Ishak et al., 2020; Kiely et al., 2010).

Em nosso estudo, dos 151 indivíduos novamente submetidos ao ensaio CLIA, 93 (62%) apresentaram positividade, sendo selecionados para a realização dos testes confirmatórios. Através do WB, principal metodologia utilizada para confirmação do tipo de HTLV, identificamos 30 (20%) amostras positivas, 10 (7%) indeterminados e 111 (73%) negativos. Em adição, através do FC-Simplex foram identificados 26 (29%) amostras positivas e 67 (71%) negativos para HTLV. Os casos indeterminados no ensaio de WB podem estar associados ao período de soroconversão do indivíduo, bem como a reações cruzadas, que dificultam o diagnóstico preciso do HTLV. A reatividade cruzada pode estar atrelada a indivíduos que possuíam infecção recente por *P. falciparum*, visto que estudos em zonas endêmicas comprovaram que a infecção pelo parasito pode ser um interferente capaz de produzir falsos positivos no WB (Hayes et al., 1991). Digno de nota, a Região Amazônica é considerada área endêmica para malária no país, registrando 99% dos casos autóctones, isso poderia contribuir para o número de casos indeterminados observados (Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015; Ishak et al., 2020).

Em relação a comparação dos ensaios avaliados, quando categorizamos em zonas muito baixas, baixas e altas (Figura 2) de acordo com o ponto de corte da sensibilidade da CLIA, foram identificadas que as zonas muito baixa e baixa foram negativas nos ensaios de WB e FC-Simplex. O ponto de corte muito baixo da CLIA é um bom fator para utilização dessa metodologia como teste de triagem, pois ele foi capaz de apresentar sensibilidade de 100% nas amostras analisadas, assim como em outros trabalhos realizados para a verificação de aplicação desse ensaio na triagem (Guiraud et al., 2023; Kiely et al., 2010; Tosswilland Taylor, 2018; Yun et al., 2019).

Apesar das fragilidades da CLIA em relação ao período de soroconversão dos indivíduos, além da reatividade cruzada, o teste se mostra eficiente para impedir a passagem e distribuição de bolsas de sangue contaminadas com o vírus HTLV. No entanto, o mesmo, não possui a mesma eficiência para ser utilizado como método de diagnóstico para o vírus, em função da sua baixa acurácia (62,4%) quando comparado ao WB. Por outro lado, o ensaio FC-Simplex (ainda em fase de validação), apresentou melhor desempenho (acurácia = 91,5%), podendo ser utilizado para confirmação do processo de triagem, antes da confirmação do diagnóstico diferencial com o WB ou qPCR (Coelho-dos-Reis et al., 2017). Adicionalmente, observamos que o FC-Duplex, ensaio responsável pela distinção viral do HTLV-1 e HTLV-2

como fase posterior ao FC-Simplex, também apresentou excelentes resultados, com concordância de 100% para as amostras analisadas (Coelho-dos-Reis et al., 2017; Pimenta de Paiva et al., 2022). Embora esses resultados sejam promissores, notamos que apenas o critério 1 (MT-2 1;32 menos MoT 1;32) (Pimenta de Paiva et al., 2022) foi considerado satisfatório para concordância com os resultados do WB, onde foram identificadas 15 (100%) amostras reativas para HTLV-1 e 7 (100%) para HTLV-2, destacando a capacidade do FC-Duplex na distinção viral do HTLV, tendo um custo baixo e podendo ser um ensaio acessível aos bancos de sangue do Brasil.

É importante destacar, que nosso estudo possui algumas limitações. No levantamento inicial de indivíduos reativos para HTLV, foram identificados 409 doadores de sangue reativos para o vírus. Contudo, devido à falta de atualização dos cadastros na base da dados instituição, não foi possível obter contato com um número expressivo de indivíduos, e uma grande parcela não demonstrou interesse em retornar para a nova realização do CLIA, o que acabou impactando significativamente no quantitativo do estudo. Em adição, não realizamos a técnica de qPCR, que forneceria dados valiosos para comparação com as outras metodologias, além de poder elucidar o status sorológico das 10 amostras que foram categorizadas como indeterminados no WB. Por fim, em função do estado do Amazonas ser uma área endêmica para malária, é importante avaliar uma possível coinfeção desses indivíduos, visando à eliminação de possíveis reações cruzadas.

## 5. CONCLUSION

Nossos resultados demonstram a baixa soroprevalência do HTLV entre os candidatos a doação de sangue no estado do Amazonas, demonstrando que os níveis se mantiveram menores, em comparação com outros estados da região Norte do Brasil. Também demonstramos que a CLIA apresenta uma ótima eficácia na etapa de triagem dos candidatos a doação de sangue. Em adição, o FC-simplex e FC-Duplex foram capazes de identificar amostras reativas, além de fazer a distinção em HTLV-1 e 2, destacando-se como uma metodologia promissora para confirmação da infecção pelo HTLV e além da diferencial de acordo com o tipo de vírus, após os testes de triagem. Incentivamos que estudos adicionais sejam realizados, especialmente em outras populações de estudo, visando fornecer um melhor panorama sobre a prevalência do HTLV-1/2 na Região Amazônica.

## **6. DATA AVAILABILITY STATEMENT**

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

## **7. ETHICS STATEMENT**

The present study was submitted to and approved by the Ethical Committee at Fundação HEMOAM, under the protocol registration number #739.563/2014. The participants read and signed the informed consent form prior to inclusion in the study. The study fulfills the principles of the Helsinki declaration and the 466/2012 resolution of the Brazilian National Health Council for research involving human participants.

## **8. CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **9. AUTHOR CONTRIBUTIONS**

FAS, MSSA, GSP, OAM-F and AGC designed, performed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. FAS, MSSA, OAM-F and AGC analyzed data. FAS, CLSC, UHSP, IVS, JPM, JSM, GLS, NDA, CMM and AGC recruited all individuals, performed the experiments, and revised the manuscript. ACRV, GSP, FM-G, OAM-F and AGC revised the manuscript. ACRV, GSP, MSSA, OAM-F and AGC supervised the project development, designed the experiments, interpreted the data, wrote, and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## **10. FUNDING**

Financial support was provided in the form of grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program #002/2008, #007/2018 and #005/2019, PRODOC Program #003/2022; STARTUP PARA O SUS Program #012/2022 and POSGRAD Program #005/2022 and #002/2023), Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PROCAD-Amazônia 2018 Program - #88881.200581/2018-01). FAS, CLSC, JPM, IVS and GLS have fellowships from FAPEAM, FAPEMIG and CAPES (MSc students). FM-Gand JSM have fellowships from FAPEAM and CAPES (PhD students). UHSP have fellowships from FAPEAM (Scientific Initiation student). ACRV and OAM-F is a level 1 research fellow from CNPq. OAM-F is research fellow from FAPEAM (PVN-II). AGC is a level 2 research fellow from CNPq and a research fellow from FAPEAM. The funders had no role in study design and decision to publish, or preparation of the manuscript.

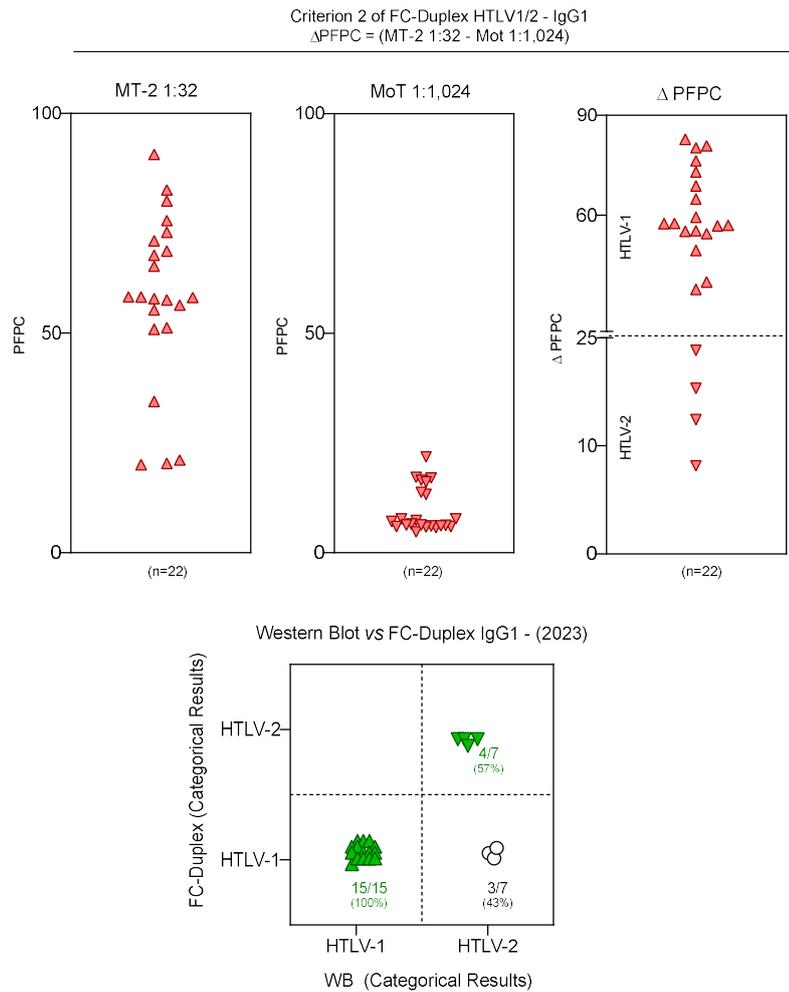
## 11. REFERENCES

- Beilke, M.A., 2012. Retroviral Coinfections: HIV and HTLV: Taking Stock of More Than a Quarter Century of Research. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28, 139–147. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0342>
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2015. *Boletim Epidemiológico* 46, 1–5. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000400010>
- Campos, K.R., Santos, F.L.N., da Silva Brito, V., Gonçalves, N.L.S., Araujo, T.H.A., Galvão-Castro, B., Caterino-de-Araujo, A., 2019. Line Immunoassay for Confirmation and Discrimination of Human T-Cell Lymphotropic Virus Infections in Inconclusive Western Blot Serum Samples from Brazil. *J Clin Microbiol* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-19>
- Carneiro-Proietti, A.B.F., Ribas, J.G.R., Catalan-Soares, B.C., Martins, M.L., Brito-Melo, G.E.A., Martins-Filho, O.A., Pinheiro, S.R., Araújo, A. de Q.-C., Galvão-Castro, B., Oliveira, M.S.P. de, Guedes, A.C., Proietti, F.A., 2002. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *RevSocBras Med Trop* 35, 499–508. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000500013>
- Castro-Costa, C.M. De, Araújo, A.Q.C., Barreto, M.M., Takayanagui, O.M., Sohler, M.P., Silva, E.L.M. Da, Paula, S.M.B. De, Ishak, R., Ribas, J.G.R., Roviroso, L.C., Carton, H., Gotuzzo, E., Hall, W.W., Montano, S., Murphy, E.L., Oger, J., Remondegui, C., Taylor, G.P., 2006. Proposal for Diagnostic Criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-Associated Myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Hum Retroviruses* 22, 931–935. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.931>
- Catalan-Soares, B., Carneiro-Proietti, A.B. de F., Proietti, F.A., 2005a. 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. *CadSaude Publica* 21, 926–931. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000300027>

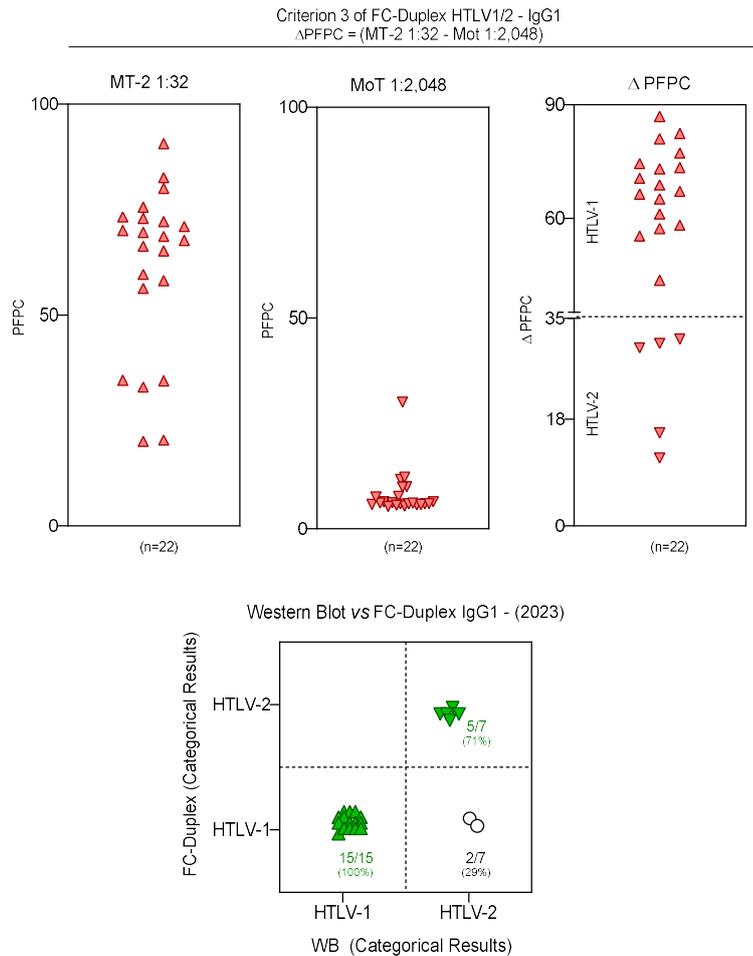
- Catalan-Soares, B., Carneiro-Proietti, A.B. de F., Proietti, F.A., 2005b. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *CadSaude Publica* 21, 926–931. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000300027>
- Catalan-Soares, B.C., Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B. de F., 2001. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 4, 81–95. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2001000200003>
- Coelho-dos-Reis, J.G., Peruhype-Magalhães, V., Pascoal-Xavier, M.A., de Souza Gomes, M., do Amaral, L.R., Cardoso, L.M., Jonathan-Gonçalves, J., Ribeiro, Á.L., Starling, A.L.B., Ribas, J.G., Gonçalves, D.U., de Freitas Carneiro-Proietti, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., 2017. Flow cytometric-based protocols for assessing anti-MT-2 IgG1 reactivity: High-dimensional data handling to define predictors for clinical follow-up of Human T-cell Leukemia virus type-1 infection. *J ImmunolMethods* 444, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.02.006>
- Coelho-dos-Reis, J.G.A., Martins-Filho, O.A., de Brito-Melo, G.E.A., Gallego, S., Carneiro-Proietti, A.B., Souza, J.G., Barbosa-Stancioli, E.F., 2009. Performance of IgG and IgG1 anti-HTLV-1 reactivity by an indirect immunofluorescence flow cytometric assay for the identification of persons infected with HTLV-1, asymptomatic carriers and patients with myelopathy. *J Virol Methods* 160, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.007>
- da Motta Passos, L.N., de Moraes, M.P.E., Tamegão-Lopes, B., de Lemos, J.A.R., de Lima Machado, P.R., Mira, M.T., Talhari, S., 2014. Absence of HTLV-1/2 infection and dermatological diseases in Manaus, State of Amazonas, Brazil. *RevSocBras Med Trop* 47, 507–509. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0196-2013>
- Galvao-Castro, B., Loures, L., Rodrigues, L., Sereno, A., Ferreira Junior, O., Franco, L., Muller, M., Sampaio, D., Santana, A., Passos, L., Proietti, F., 1997. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion (Paris)* 37, 242–243. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x>
- Gessain, A., Cassar, O., 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>
- Gross, C., Thoma-Kress, A.K., 2016. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v8030074>
- Guiraud, V., Crémoux, F., Leroy, I., Cohier, J., Hernandez, P., Mansaly, S., Gautheret-Dejean, A., 2023. Comparison of two new HTLV-I/II screening methods, Abbott AlinityirHTLV-I/II and Diasorin LIAISON® XL murex recHTLV-I/II, to Abbott architect rHTLVI/II assay. *Journal of Clinical Virology* 164, 105446. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2023.105446>
- Hayes, C.G., Burans, J.P., Oberst, R.B., 1991. Antibodies to Human T Lymphotropic Virus Type I in a Population from the Philippines: Evidence for Cross-Reactivity with *Plasmodium falciparum*. *Journal of Infectious Diseases* 163, 257–262. <https://doi.org/10.1093/infdis/163.2.257>

- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., Bangham, C.R.M., 2003. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. *Science* (1979) 299, 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1080115>
- Ishak, R., de Oliveira Guimarães Ishak, M., Vallinoto, A.C.R., 2020. The challenge of describing the epidemiology of HTLV in the Amazon region of Brazil. *Retrovirology* 17, 4. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-0512-z>
- Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Blayney, D., Gallo, R.C., 1982. A New Subtype of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II) Associated with a T-Cell Variant of Hairy Cell Leukemia. *Science* (1979) 218, 571–573. <https://doi.org/10.1126/science.6981847>
- Kiely, P., Walker, K., Parker, S., Cheng, A., 2010. Analysis of sample-to-cutoff ratios on chemiluminescent immunoassays used for blood donor screening highlights the need for serologic confirmatory testing. *Transfusion (Paris)* 50, 1344–1351. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02572.x>
- Kitagawa, T., 1986. Antibodies to HTLV-I in Japanese Immigrants in Brazil. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 256, 2342. <https://doi.org/10.1001/jama.1986.03380170058009>
- Mahieux, R., Gessain, A., 2011. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects. *Viruses* 3, 1074–1090. <https://doi.org/10.3390/v3071074>
- Martinez, M.P., Al-Saleem, J., Green, P.L., 2019. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* 16, 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0483-0>
- Martins, M.L., Santos, A.C. da S., Namen-Lopes, M.S., Barbosa-Stancioli, E.F., Utsch, D.G., Carneiro-Proietti, A.B. de F., 2010. Long-term serological follow-up of blood donors with an HTLV-Indeterminate Western Blot: Antibody Profile of Seroconverters and Individuals With False Reactions. *J Med Virol* 82, 1746–1753. <https://doi.org/10.1002/jmv.21881>
- Morais, M.P.E. de, Gato, C.M., Maciel, L.A., Lalwani, P., Costa, C.A., Lalwani, J.D.B., 2017. Prevalence of Human T-lymphotropic virus type 1 and 2 among blood donors in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 59. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759080>
- Moreno, C., Balangero, M., Barbás, M.G., Cudolá, A., Gallego, S., 2013. Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir estatus serológico endonantes de sangre. *Rev Argent Microbiol* 45, 165–168. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70019-1](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70019-1)
- Namen-Lopes, M.S.S., Martins, M.L., Drummond, P.C., Lobato, R.R., Carneiro-Proietti, A.B.F., 2009. Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. *Transfusion Medicine* 19, 180–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2009.00932.x>

- Pimenta de Paiva, L., Coelho-dos-Reis, J.G.A., Trindade, B.C., Peruhype-Magalhães, V., Silva Araújo, M.S., Gonçalves, J.J., Nogueira-Souza, A.C., Pereira Martins, J., Lopes Ribeiro, Á., Starling, A.L., Alcântara, L.C.J., Ribeiro, M.A., Carneiro-Proietti, A.B. de F., Sabino, E.C., Alves Bicalho, K., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., 2022. A New Flow Cytometry-Based Single Platform for Universal and Differential Serodiagnosis of HTLV-1/2 Infection. *Front Immunol* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.795815>
- Rosadas, C., Brites, C., Arakaki-Sánchez, D., Casseb, J., Ishak, R., 2021. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 30. <https://doi.org/10.1590/s1679-497420200006000015.espl>
- Roucoux, D.F., Murphy, E.L., 2004. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 6, 144–54.
- Takatani, M., Crispim, M.E., Fraiji, N., Stefani, M.M.A., Kiesslich, D., 2017. Clinical and laboratory features of HTLV-I asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 59. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759005>
- Tosswill, J.H.C., Taylor, G.P., 2018. Interpretation of low reactivity in the Abbott Architect rHTLV I/II assay. *Transfusion Medicine* 28, 326–330. <https://doi.org/10.1111/tme.12482>
- Uchiyama, T., 1997. HUMAN T CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE I (HTLV-I) AND HUMAN DISEASES. *Annu Rev Immunol* 15, 15–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.15>
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., Gotuzzo, E., 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* 7, 266–281. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70081-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70081-6)
- Willems, L., Hasegawa, H., Accolla, R., Bangham, C., Bazarbachi, A., Bertazzoni, U., Carneiro-Proietti, A.B. de F., Cheng, H., Chieco-Bianchi, L., Ciminale, V., Coelho-dos-Reis, J., Esparza, J., Gallo, R.C., Gessain, A., Gotuzzo, E., Hall, W., Harford, J., Hermine, O., Jacobson, S., Macchi, B., Macpherson, C., Mahieux, R., Matsuoka, M., Murphy, E., Peloponese, J.-M., Simon, V., Tagaya, Y., Taylor, G.P., Watanabe, T., Yamano, Y., 2017. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res* 137, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.015>
- Yun, S.G., Kim, S., Sohn, J.Y., Cho, Y., 2019. Evaluation of Elecsys HTLV-I/II assay in comparison with ARCHITECT rHTLV-I/II assay with Korean samples. *J Clin Lab Anal* 33. <https://doi.org/10.1002/jcla.22909>



**Supplementary Figure 1. Desempenho do ensaio FC-Duplex IgG1 na distinção em HTLV-1/2 após a etapa de triagem utilizando o critério 2.** (A) Visualização da reatividade para os tipos HTLV-1 e HTLV-2 nas linhagens MT-2 (1:32) e MoT (1:32), respectivamente, utilizando o Critério 2 do FC-Duplex IgG1. (B) Avaliação da concordância entre os resultados Western Blot vs FC-Duplex HTLV-1/2 IgG1. PFPC, percentual de células fluorescentes positivas.



**Supplementary Figure 2. Desempenho do ensaio FC-Duplex IgG1 na distinção em HTLV-1/2 após a etapa de triagem utilizando o critério 3.** (A) Visualização da reatividade para os tipos HTLV-1 e HTLV-2 nas linhagens MT-2 (1:32) e MoT (1:32), respectivamente, utilizando o Critério 3 do FC-Duplex IgG1. (B) Avaliação da concordância entre os resultados Western Blot vs FC-Duplex HTLV-1/2 IgG1. PPFC, percentual de células fluorescentes positivas.

## 6. CONCLUSÃO

As metodologias utilizadas em nosso estudo possuem capacidade para a identificação e distinção do vírus HTLV na população infectada durante anos, com melhorias e atualizações no decorrer de suas produções. No entanto, a identificação e diagnóstico de indivíduos infectados ainda permanece pouco acessível, principalmente na população assintomática e que pode ser responsável pela transmissão do vírus.

Os resultados apresentados aqui colaboram também para assegurar a qualidade das metodologias utilizadas ou validar as novas metodologias, como o FC-Simplex e FC-Duplex para que elas possam vir ser utilizadas em populações futuras com o intuito de diminuir o tempo de espera para o diagnóstico ou assegurar que estes sejam entregues com a maior qualidade possível. Além disso, o uso de novos ensaios com mais acurácia pode atender a demanda clínica ou específica e a população com um todo, seja por resultados positivos ou negativos, bem como a diminuição dos casos inconclusivos ou indeterminados para contribuir com a melhora no atendimento seja pelo sistema único de saúde ou instituições privadas. Vale lembrar que as produções científicas não somente servem a fins de títulos ou recompensas de outros fins, mas sim a melhora no suporte de saúde da população e entendimento sobre os microrganismos e meios com os quais possamos estudar estes e seus impactos na sociedade.

Os bons resultados encontrados na sensibilidade da CLIA bem como na técnica de WB que teve como referência para as análises dos ensaios restantes foram satisfatórias para assegurar e incentivar no uso contínuo desses ensaios como método de triagem e diagnóstico em doadores de sangue na fundação HEMOAM, bem como seu uso nos demais grupos atendidos em outras instituições. As metodologias FC-Duplex e FC-Simplex tornam-se uma boa alternativa para a realização do uso em diagnóstico para HTLV-1/2, que os próximos passos sejam promissores para que as técnicas sejam utilizadas em grande escala e que atendam a população como um todo.

Portanto, instigamos que estudos como esse continuem a ser realizados em décadas futuras para que possa melhor atender a população que precise, bem como atualizar os dados apresentados aqui e quem sabe trazer novas metodologias mais simples e eficazes quanto as que possuímos nos centros de atendimento e acompanhamento à saúde da população, assegurando o acesso ao diagnóstico correto e seguro para todos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pimenta de Paiva L, Coelho-dos-Reis JGA, Trindade BC, et al. A New Flow Cytometry-Based Single Platform for Universal and Differential Serodiagnosis of HTLV-1/2 Infection. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.795815
2. Oota S, Chaiwong K, Pikulsod S, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I and II

- seroprevalence among volunteer blood donors in Thailand. *Pathog Glob Health*. 2018;112(7):343-348. doi:10.1080/20477724.2018.1541576
3. YOSHIE O. CCR4, HTLV-1 infection, and ATL oncogenesis. *Uirusu*. 2008;58(2):125-140. doi:10.2222/jsv.58.125
  4. Martinez MP, Al-Saleem J, Green PL. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2019;16(1):21. doi:10.1186/s12977-019-0483-0
  5. Mahieux R, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(2):161-166. doi:10.1016/j.patbio.2008.02.015
  6. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(22):7994-7999. doi:10.1073/pnas.0501734102
  7. Cassar O, Gessain A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. In: ; 2017:3-24. doi:10.1007/978-1-4939-6872-5\_1
  8. Lopes MSSN, Proietti ABFC. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: A contribuição dos estudos de look-back. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(3):229-240. doi:10.1590/S1516-84842008000300013
  9. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 2012;3. doi:10.3389/fmicb.2012.00388
  10. Orletti MPS, Assone T, Sarnaglia GD, et al. Prevalence of infection by human T Cell lymphotropic viruses (HTLV-1/2) in adult population in Vitória-ES. *Brazilian J Infect Dis*. 2021;25(5):101631. doi:10.1016/j.bjid.2021.101631
  11. Zhao J, Zhao F, Han W, et al. HTLV screening of blood donors using chemiluminescence immunoassay in three major provincial blood centers of China. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):581. doi:10.1186/s12879-020-05282-2
  12. Kapprell HP, Stieler M, Oer M, et al. Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II assay for blood screening and diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;67(1):61-69. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.021
  13. Moreno C, Balangero M, Barbás MG, Cudolá A, Gallego S. Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir el estatus serológico en donantes de sangre. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(3):165-168. doi:10.1016/S0325-

- 7541(13)70019-1
14. Hayes CG, Burans JP, Oberst RB. Antibodies to Human T Lymphotropic Virus Type I in a Population from the Philippines: Evidence for Cross-Reactivity with *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 1991;163(2):257-262. doi:10.1093/infdis/163.2.257
  15. Takatani M, Crispim ME, Fraiji N, Stefani MMA, Kiesslich D. Clinical and laboratory features of HTLV-I asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59. doi:10.1590/s1678-9946201759005
  16. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, et al. A New Subtype of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II) Associated with a T-Cell Variant of Hairy Cell Leukemia. *Science (80- )*. 1982;218(4572):571-573. doi:10.1126/science.6981847
  17. Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 1995;86(10):3619-3639. doi:10.1182/blood.v86.10.3619.bloodjournal86103619
  18. Switzer WM, Salemi M, Qari SH, et al. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. *Retrovirology*. 2009;6(1):9. doi:10.1186/1742-4690-6-9
  19. Beilke MA. Retroviral Coinfections: HIV and HTLV: Taking Stock of More Than a Quarter Century of Research. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(2):139-147. doi:10.1089/aid.2011.0342
  20. Bryan ES, Tadi P. *Human T-Cell Lymphotropic Virus*; 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30854194>
  21. Gross C, Thoma-Kress AK. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. *Viruses*. 2016;8(3). doi:10.3390/v8030074
  22. Nakano K, Watanabe T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. *Front Microbiol*. 2012;3. doi:10.3389/fmicb.2012.00330
  23. Yamauchi J, Araya N, Yagishita N, Sato T, Yamano Y. An update on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) focusing on clinical and laboratory biomarkers. *Pharmacol Ther*. 2021;218:107669. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107669
  24. ISHAK R, HARRINGTON WJ, AZEVEDO VN, et al. Identification of Human T Cell Lymphotropic Virus Type IIa Infection in the Kayapo, an Indigenous Population of

- Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11(7):813-821. doi:10.1089/aid.1995.11.813
25. Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PKC, et al. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. *Science* (80- ). 2003;299(5613):1713-1716. doi:10.1126/science.1080115
  26. Kitagawa T. Antibodies to HTLV-I in Japanese Immigrants in Brazil. *JAMA J Am Med Assoc*. 1986;256(17):2342. doi:10.1001/jama.1986.03380170058009
  27. Switzer WM, Owen SM, Pieniazek DA, et al. Molecular analysis of human T-cell lymphotropic virus type II from Wayuu Indians of Colombia demonstrates two subtypes of HTLV-IIb. *Virus Genes*. 1995;10(2):153-162. doi:10.1007/BF01702596
  28. Morais MPE de, Gato CM, Maciel LA, Lalwani P, Costa CA, Lalwani JDB. Prevalence of Human T-lymphotropic virus type 1 and 2 among blood donors in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59. doi:10.1590/s1678-9946201759080
  29. Prendergast AJ, Goga AE, Waitt C, et al. Transmission of CMV, HTLV-1, and HIV through breastmilk. *Lancet Child Adolesc Heal*. 2019;3(4):264-273. doi:10.1016/S2352-4642(19)30024-0
  30. Medeiros ACM, Vidal LRR, Von Linsingen R, et al. Confirmatory molecular method for HTLV-1/2 infection in high-risk pregnant women. *J Med Virol*. 2018;90(5):998-1001. doi:10.1002/jmv.25014
  31. Yamano Y, Sato T. Clinical Pathophysiology of Human T-Lymphotropic Virus-Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Front Microbiol*. 2012;3. doi:10.3389/fmicb.2012.00389
  32. Xu X, Kalac M, Markson M, et al. Reversal of CYLD phosphorylation as a novel therapeutic approach for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Cell Death Dis*. 2020;11(2):94. doi:10.1038/s41419-020-2294-6
  33. Fauzi YR, Nakahata S, Chilmi S, et al. Antitumor effects of chloroquine/hydroxychloroquine mediated by inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway through abrogation of autophagic p47 degradation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. Velasco G, ed. *PLoS One*. 2021;16(8):e0256320. doi:10.1371/journal.pone.0256320
  34. Imaizumi Y, Iwanaga M, Nosaka K, et al. Prognosis of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma in Japan: A nationwide hospital-based study. *Cancer Sci*.

- 2020;111(12):4567-4580. doi:10.1111/cas.14658
35. Oliveira PD, Ribeiro GS, Anjos RO, et al. The importance of the clinical classification of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) in the prognosis. Matsuoka M, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(10):e0010807. doi:10.1371/journal.pntd.0010807
  36. Chen PT, Onukogu D, Gotlieb G, et al. HTLV-1-Associated Lymphoma Presented as Massive Lymphadenopathy. *J Investig Med High Impact Case Reports*. 2021;9:232470962110132. doi:10.1177/23247096211013235
  37. Yamakawa N, Yagishita N, Matsuo T, et al. Creation and validation of a bladder dysfunction symptom score for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):175. doi:10.1186/s13023-020-01451-3
  38. Martin F, Gilks CF, Gibb R, et al. Human T-cell leukaemia virus type 1 and Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Queensland, Australia: a retrospective cross-sectional study. *Sex Transm Infect*. 2023;99(1):50-52. doi:10.1136/sextrans-2021-055241
  39. Kamihira S, Nakashima S, Saitoh S, Kawamoto M, Kawashima Y, Shimamoto M. Chemiluminescence Immunoassay to Detect Anti-HTLV-I Antibodies. *Japanese J Cancer Res*. 1993;84(8):834-837. doi:10.1111/j.1349-7006.1993.tb02053.x
  40. Caterino-de-Araujo A, Campos KR, Alves IC, Vicentini AP. HTLV-1 and HTLV-2 infections in patients with endemic mycoses in São Paulo, Brazil: A cross-sectional, observational study. *Lancet Reg Heal - Am*. 2022;15:100339. doi:10.1016/j.lana.2022.100339
  41. Queiroz MAF, Amoras E da SG, Moura TCF, et al. The SAMHD1 rs6029941 (A/G) Polymorphism Seems to Influence the HTLV-1 Proviral Load and IFN-Alpha Levels. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.00246
  42. Ji H, Chang L, Yan Y, Wang L. Development and validation of a duplex real-time PCR for the rapid detection and quantitation of HTLV-1. *Virology*. 2023;20(1):9. doi:10.1186/s12985-023-01970-y
  43. Coelho-dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Pascoal-Xavier MA, et al. Flow cytometric-based protocols for assessing anti-MT-2 IgG1 reactivity: High-dimensional data handling to define predictors for clinical follow-up of Human T-cell Leukemia virus type-1 infection. *J Immunol Methods*. 2017;444:36-46. doi:10.1016/j.jim.2017.02.006

## 8. APENDICE

### 8.1. Equipe de execução do projeto

Nome	Instituição	Formação Acadêmica	Função no projeto
Felipe Araujo dos Santos	UEA/HEMOAM	Biomédico	Mestrando
Allyson Guimarães da Costa	UFAM/HEMOAM	Enfermeiro	Orientador
Olindo Assis Martins Filho	CPIRR-Fiocruz-MG	Farmacêutico-Bioquímico	Coorientador
Adriana Malheiro Alle Marie	UFAM/HEMOAM	Bióloga	Colaboradora
Andréa Teixeira Carvalho	CPIRR-Fiocruz-MG	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Andréa Monteiro Tarragô	UEA/HEMOAM	Farmacêutica-Bioquímica	Colaboradora
Claudio Lucas dos Santos Catão	UEA/HEMOAM	Biomédico	Colaborador
Fábio Magalhães da Gama	CPIRR-Fiocruz-MG	Biomédico	Colaborador
Isabelle Vasconcelos de Sousa	UFAM/PPGIBA	Enfermeira	Colaboradora
Maria do Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho	HEMOAM	Médica	Colaboradora
Uzamor Henrique Soares Pessoa	UEA/HEMOAM	Graduação-Biomedicina	Colaborador

## 9. ANEXOS

### 9.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HEMOAM

<b>FUNDAÇÃO HEMATOLOGIA HEMOTERAPIA</b>
<b>PARECER CONSUBST</b>
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>
<b>Título da Pesquisa:</b> Utilização do FC-DUPLEX HTLV-1 Infecção Humana pelo HTLV-1 e 2
<b>Pesquisador:</b> Allyson Guimarães da Costa
<b>Área Temática:</b>
<b>Versão:</b> 2
<b>CAAE:</b> 57153922.5.0000.0009
<b>Instituição Proponente:</b> Fundação de Hematologia e Hemoterapia
<b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio
<b>DADOS DO PARECER</b>
<b>Número do Parecer:</b> 5.348.608
<b>Apresentação do Projeto:</b>
O projeto tem como título: Validação do FC-Duplex HTLV-1 e HTLV-2 no Hemocentro do Américas de triagem e confirmativas dos retrovirus pesq associação com neoplasias e neuropatologias. De acord utilizadas atualmente possuem limitações em relação HTLV, apresentam alto custo e resultados indeterminad HTLV-1/2 IgG1 para diagnóstico diferencial da infecç prospectivo, onde serão coletadas amostras de sangue Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia de janeiro de 2018 a dezembro de 2021 que serão contatai e/ou equipe do projeto para participação no estudo. A li participantes será obtida no Departamento de Sistema amostras, por conveniência, sendo 350 amostras de H

## 9.2. Procedimento operacional padrão de coletas e processamento de amostras - POP

### 1. OBJETIVO

Descrever e padronizar os procedimentos e técnicas para coleta e manuseio de sangue dos participantes do estudo: Validação do FC-Duplex HTLV-1/2 IgG diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2 no Hemocentro do Amazonas - HEMOAM.

## 2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se aos colaboradores da pesquisa envolvidos no processo de coleta e manuseio de sangue dos participantes do projeto em HTLV 1-2

## 3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

**HTLV:** vírus linfotrópico de células T humanas

**FC-Duplex HTLV 1-2:** metodologia a ser validada mediante identificação e distinção de amostras coletadas e confirmadas no Hemocentro do Amazonas

**POP:** Procedimento Operacional Padronizado.

**HEMOAM:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

## 4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela implantação e treinamento dos membros da equipe para a aplicação deste POP caberá ao pesquisador responsável do projeto de pesquisa ou a alguém da equipe do estudo por ele designado. A responsabilidade pelas atividades descritas neste POP é do pesquisador responsável do estudo e serão executadas pelos membros da equipe do estudo delegados para a realização delas.

## 5. FLUXOGRAMAS

Identificação do doador mediante documentação

Apresentação do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido ao doador

Identificação dos tubos de coleta necessários para o procedimento

Realização de punção venosa no doador da amostra

Armazenagem das amostras em hacker para guardar em freezer



## 6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

## 6.1. Condições de estocagem dos materiais de coleta e controle do estoque

Todos os tubos devem ser mantidos estocados em temperatura entre 2° e 30°C. Os colaboradores do projeto devem possuir um controle da quantidade de tubos disponíveis no centro de pesquisa, bem como todos os outros materiais utilizados na coleta para o projeto HTLV. Mensalmente deverá encaminhar para o coordenador de estudos o controle de estoque destes materiais, para se caso seja necessário o pedido ou compra destes.

## 6.2. Materiais Necessários

- Equipamentos de Proteção Individual: jaleco, máscara, óculos, luvas descartáveis;
- Algodão hidrófilo, álcool etílico a 70%;
- Sistema à vácuo: suporte, tubo e agulha 21 e 23 para coleta à vácuo;
- Recipiente com a boca larga, com paredes rígidas e tampa para o descarte de material perfuro cortantes - resíduo tipo E – RDC N° 306/04;
- Tubos de coleta de amostras contendo anticoagulante do tipo EDTA e tubos contendo gel separador;
- Seringa descartável de 10ml com agulha;
- Caneta pincel;
- Curativos para punção venosa;
- Estantes para tubos;
- Etiquetas para identificação de amostras;
- Caixas térmicas;
- Tubos criogênicos;

## 6.3. Preparo da Coleta

1. Verificar os tubos que serão utilizados;
2. Separar as respectivas etiquetas de identificação dos tubos do estudo;
3. Lavar bem as mãos;
4. Higienizar a bancada do laboratório de coleta com álcool 70°;
5. Separar os demais materiais que serão utilizados para o processo;
6. Instruir claramente o participante sobre o procedimento;
7. Verificar os dados;
8. Identificar os tubos com as iniciais do paciente, além das etiquetas de identificação;
9. Abrir o lacre da seringa ou agulha para coleta de sangue à vácuo de forma que o paciente possa visualizar o procedimento;
10. Palpar a veia a ser puncionada;
11. Fazer a assepsia do local a ser puncionado com álcool 70%, aplicando em movimentos circulares, do centro para a periferia, três vezes, aguardando secar por cerca de 30 segundos. Não palpar a veia após a assepsia;
12. Garrotear o braço do paciente e pedir que abra e feche a mão;

13. Fazer a punção em um ângulo oblíquo de 30°. Se necessário, para melhor visualizar a veia, esticar a pele com a outra mão (longe do local onde foi feita a assepsia);

14. Quando o sangue começar a fluir dentro do primeiro tubo, desgarrotear o braço do paciente e pedir para que abra a mão;

15. Tubos que possuem anticoagulante devem ser homogeneizados gentilmente de 8 a 10 vezes imediatamente após a coleta deste (**Figura 1**);



**Figura 1**–Esquema demonstrativo para coleta de sangue.

## 6.6. Procedimentos pós-coleta

1. Após finalizar a coleta, recolher a agulha da veia do paciente;
2. Com um algodão exercer pressão no local, por 1 a 2 minutos, a fim de se evitar a formação de hematomas e sangramentos, em seguida colocar o curativo *blood stop* no local da punção;
3. Orientar o paciente para que não dobre o braço. Não carregue peso ou bolsa a tiracolo no mesmo lado da punção, por no mínimo 1 hora;
4. O material utilizado na coleta deve ser descartado em recipiente apropriado (Recipiente com a boca larga, com paredes rígidas e tampa para o descarte de material perfuro cortantes - resíduo tipo E – RDC N° 306/04);
5. Verificar se existe alguma pendência, certificar-se das condições gerais do paciente e liberá-lo(a).
6. Transportar as amostras nas condições de segurança e temperatura (2-8°C), com os tubos em estantes seguras que deixem que as amostras fiquem em posição segura e dentro de maletas ou caixa de isopor devidamente identificadas para transporte de amostra biológica.

## 6.7. Processamento da amostra

**As amostras em tubos com gel separador deverão ser:**

- Centrifugadas a 3.500 rpm / 5 minutos para obtenção do soro
- Alíquotadas em 3 tubos criogênicos contendo 600µL de soro cada
- Deverá ser realizado a configuração e impressão de etiqueta para identificação de cada tubo
- As alíquotas deverão ser armazenadas na caixa de cor laranja e armazenadas a -80°C no laboratório multidisciplinar

**As amostras em tubos contendo anticoagulante EDTA deverão ser:**

- Homogeneizadas cuidadosamente 10 vezes
- Aliquotadas em 2 tubos criogênicos #1 e #2 contendo 500µL de sangue com EDTA cada
- O tubo da coleta de sangue com EDTA contendo a amostra restante deverá ser centrifugada a 1.500rpm / 5 minutos
- O tubo deverá ser retirada cuidadosamente da centrifuga para que não haja ressuspensão do material centrifugado e deverá ser coletada apenas o buffycoat (nuvem leucocitária) da amostra, com o auxílio da pipeta retirar o máximo possível da camada do plasma e em seguida retirar cuidadosamente o buffycoat, chegando ao volume final de 600µL de alíquota
- Deverá ser configurada e impressa a etiqueta para identificação dos tubos criogênicos, o terceiro tubo de alíquota deverá ser sempre a amostra do buffycoat
- As alíquotas deverão ser armazenadas em caixas de cor verde e armazenadas a -80°C no laboratório multidisciplinar

Imagem final de alíquotas processadas e identificadas:



### 9.3. Processamento das Amostras de Soro para os Testes de Quimioluminescência (CMIA) para HTLV-1/2 com o Kit Alinity's.

#### 1. OBJETIVO

Descrever e padronizar os procedimentos e técnicas para manuseio das Amostras de Soro para os Testes de Quimioluminescência (CMIA) para HTLV-1/2 com o Kit Alinity's dos participantes do estudo: Validação do FC-Duplex HTLV-1/2 IgG diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2 no Hemocentro do Amazonas - HEMOAM. Esse processo faz parte da rotina do HEMOAM para repetição dos testes de CMIA no setor de sorologia.

## **2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

Aplica-se aos colaboradores da pesquisa envolvidos no processo de coleta e manuseio de soro dos participantes do projeto Validação do FC-Duplex HTLV-1/2 IgG diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2 no Hemocentro do Amazonas – HEMOAM.

## **3. DEFINIÇÃO/SIGLAS**

**HTLV:** vírus linfotrópico de células T humanas

**FC-Duplex HTLV 1-2:** Flowcitometry – duplex HTLV-1/2, metodologia a ser validada utilizada para identificação e distinção de amostras coletadas e confirmadas no Hemocentro do Amazonas

**POP:** Procedimento Operacional Padronizado.

**HEMOAM:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

**CMIA:** Quimioluminescência

## **4. RESPONSABILIDADES**

A responsabilidade pela implantação e treinamento dos membros da equipe para a aplicação deste POP caberá ao pesquisador responsável do projeto de pesquisa ou a alguém da equipe do estudo por ele designado. A responsabilidade pelas atividades descritas neste POP é do pesquisador responsável do estudo e serão executadas pelos membros da equipe do estudo delegados para a realização delas.

## **5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES**

### 5.1. Materiais Necessários

- Equipamentos de Proteção Individual: jaleco, máscara, óculos, luvas descartáveis;
- Recipiente com a boca larga, com paredes rígidas e tampa para o descarte de material perfuro cortantes - resíduo tipo E – RDC N° 306/04;
- Caixas térmicas;
- Planilha contendo os dados das amostras a serem analisadas;

### 5.2. Preparo da Planilha de Dados e Amostras

1.A Planilha de dados das amostras deve ser elaborada contendo o número do pedido, número da bolsa e resultado da Quimioluminescência da primeira doação (conforme figura 1), sendo impressa em 2 (duas vias), necessária para recebimento no momento da entrega no setor de sorologia, uma via ficará com eles e outra será devolvida assinada por quem recebeu as amostras ao grupo de pesquisa:

Lista de Amostras – Repetição do Teste de Quimiolumir

N°	N° Pedido do Paciente	N° da Doação	Resultado
01	870913-00	B311019000374	A
02	871300-00	B311019014912	
03	871949-00	B311019011861	
04			

Figura 1: Modelo de planilha das amostras a serem testadas.

- 2.Ligar o Banho Maria, verificar se possui o quantitativo de água adequado e aguardar estabilizar a temperatura em 37°C
- 3.Em seguida, as amostras devem ser retiradas do freezer -80°C e colocadas no banho maria a 37°C durante 10minutos;
- 4.Por fim, as amostras devem ser retiradas do banho maria e armazenadas em maleta de transporte para transporte ao setor de sorologia;
- 5.Após a entrega das amostras, armazenar o recebido da equipe da Sorologia no arquivo impresso da Planilha de dados das amostras.

### 5.6. Procedimentos pós realização do teste

- 1.São coletados os resultados e as amostras no setor de Sorologia;
- 2.As amostras devem ser descartadas em recipiente adequado para descarte de amostra biológica;
- 3.Os resultados gerados do teste serão transferidos para planilha de controle dos dados gerados dos testes;

4. As amostras que ainda se mantêm reativas na CMIA serão sinalizadas para serem realizados o Western Blot, como confirmação e distinção do vírus, se for o caso, dessas amostras;

## **6. ANEXOS**

Não se aplica.

## **7. FORMULÁRIOS UTILIZADOS**

Não se aplica

### **1.1 Teste de quimioluminescência com o kit alinity's HTLV-1/2**

#### **1. OBJETIVO**

Descrever e padronizar os procedimentos e técnicas para realização do teste de *quimioluminescência-CMIA* utilizando o kit Alinity's HTLV-1/2, nas amostras do estudo: Validação do FC-Duplex HTLV-1/2 IgG diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2 no Hemocentro do Amazonas - HEMOAM.

#### **2. CAMPO DE APLICAÇÃO**

Aplica-se aos colaboradores da pesquisa envolvidos no processo de realização do teste de *Quimioluminescência-CMIA* utilizando o kit Alinity's HTLV-1/2, nas amostras de soro dos participantes do projeto em HTLV-1 e HTLV-2.

#### **3. DEFINIÇÃO/SIGLAS**

**HTLV:** vírus linfotrópico de células T humanas

**POP:** Procedimento Operacional Padronizado.

**CMIA:** Quimioluminescência

**HEMOAM:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

**RPM:** Rotações por minuto

**RCF:** Força centrífuga relativa

**g/minutos:** Força gravitacional por minuto

**S/CO:** Sample / Cut off – Amostra / valor de corte

**URL:** Unidade relativa de luz

#### **4. RESPONSABILIDADES**

A responsabilidade pela implantação e treinamento dos membros da equipe para a aplicação deste POP caberá ao pesquisador responsável do projeto de pesquisa ou a alguém da equipe do estudo por ele designado. A responsabilidade pelas atividades descritas neste POP é do pesquisador responsável do estudo e serão executadas pelos membros da equipe do estudo delegados para a realização delas.

#### **5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES**

##### **5.1 Conteúdo do kit**

- Kit de reagentes HTLV I/II da Alinity 06P07;
- Os volumes (mL) listados na tabela 1 abaixo, indicam o volume por cartucho e os constituintes do kit.

Tabela 1. Reagentes e constituintes do kit Alinity's HTLV-1/2 / 06P07

REF	06P0760
Testes por cartucho	500
Número de cartuchos por kit	10
Testes por kit	5000
<b>MICROPARTICLES</b>	27,0 ml
<b>CONJUGATE</b>	26,5ml
<b>ASSAY DILUENT</b>	26,7ml
<b>MICROPARTICLES</b>	Peptídeos sintéticos de HTLV I/HTLV II e HTLV II micropartículas revestidas com antígeno recombinante em solução salina tamponada com TRIS. Concentração mínima: 0,1% de sólidos. Conservantes: ProClin 950 e azida sódica.
<b>CONJUGATE</b>	Peptídeos sintéticos de HTLV I/HTLV II e HTLV I conjugado de antígeno recombinante marcado com acridínio em tampão HEPES com estabilizador proteico (bovino) e surfactante. Concentração máxima: Peptídeos 100,0 ng/mL cada, antígeno 10,0 ng/mL. Conservante: ProClin 950.
<b>ASSAY DILUENT</b>	Tampão TRIS com surfactante. Conservantes: ProClin 950 e azida sódica.

## 5.2 Manuseio dos reagentes

- Não inverta os cartuchos de reagentes
- Após o recebimento, os cartuchos de reagentes podem ser usados imediatamente ou armazenados na posição vertical
- Se um cartucho de reagente cair, coloque-o na posição vertical por 1 hora antes de usar para permitir que as bolhas que possam ter se formado se dissipem.
- Os reagentes são suscetíveis à formação de espuma e bolhas. As bolhas podem interferir na detecção do nível de reagente no cartucho e causar aspiração insuficiente de reagente que pode afetar adversamente os resultados.

## 5.3 Tipos de amostras

- Os tipos de amostras listados abaixo foram verificados para uso com este ensaio. Outros tipos de amostras e anticoagulantes não foram verificados com este ensaio, conforme a tabela 2.

Tabela 2. Amostras utilizadas no ensaio e seus respectivos anticoagulantes

Tipos de amostra	Anticoagulantes
Sérum (incluindo tubos separadores de soro)	Não aplicável
Plasma	EDTA dipotássico (incluindo tubos de preparação de plasma) EDTA tripotássico Heparina de lítio (incluindo tubos separadores de plasma) Citrato de sódio heparina sódica ACD-A ACD-B CP2D CPD CPDA-1

- Os anticoagulantes líquidos podem ter um efeito de diluição resultando em valores S/CO mais baixos para amostras individuais.
- O desempenho não foi estabelecido para o uso de amostras de plasmáfese.
- O desempenho não foi estabelecido para o uso de sangue do cordão umbilical ou fluidos corporais, como urina, saliva, sêmen, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano ou líquido pleural.
- O sistema não oferece a capacidade de verificar os tipos de amostras. É responsabilidade do operador verificar se os tipos de amostra corretos são usados com o ensaio.
- **Não use:**
  - espécimes inativados pelo calor
  - espécimes agrupados
  - espécimes grosseiramente hemolisados
  - espécimes com contaminação microbiana óbvia
  - espécimes com crescimento de fungos

- Para resultados precisos, as amostras de soro e plasma devem estar livres de fibrina, glóbulos vermelhos e outras partículas.
- Para evitar a contaminação cruzada, recomenda-se o uso de pipetas ou ponteiros descartáveis.

#### 5.4 Preparação para Análise

- Amostras claras e não hemolisadas devem ser usadas quando possível. Amostras contendo partículas visíveis podem fornecer resultados de teste errôneos ou inconsistentes
- As amostras devem estar livres de bolhas. Remova as bolhas com um aplicador antes da análise. Use um novo aplicador para cada amostra para evitar contaminação cruzada.
- Antes da centrifugação, as amostras previamente congeladas devem ser misturadas suavemente e completamente após o descongelamento, realizados em banho maria a 37°C.
- Todas as amostras devem ser centrifugadas entre 3.000 – 7.500 rcf/ rpm.
- Os intervalos de tempo e força aceitáveis que atendem a este critério estão listados na tabela 3abaixo.

**Tabela 2. Tempo e rotações aceitáveis para as amostras utilizadas no ensaio.**

<b>Tempo de centrifugação (Minutos)</b>	<b>RCF (xg)</b>	<b>g-minutos</b>
10	3000	30.000
15	2000 - 3000	30.000 - 45.000
20	1500 - 3000	30.000 - 60.000
25	1300 - 3000	32.500 - 75.000

#### 5.5 Calibração

- Três réplicas do Calibrador 1 de HTLV I/II da Alinity são testadas automaticamente pelo sistema. O calibrador deve ser carregado prioritariamente.

- Cada controle de ensaio deve ser testado para avaliar a calibração do ensaio. Uma vez que uma calibração é aceita e armazenada, ela pode ser usada por 14 dias. A menos que um novo lote de teste seja iniciado ou os limites de referência do calibrador se apresentem fora dos intervalos aceitos, poderá ser utilizada essa calibração durante o período informado.
- O relatório de calibração deve ser impresso e arquivado junto dos resultados de amostras do projeto de pesquisa para verificação dos parâmetros posteriormente.

### **5.6 Inserção da amostra no aparelho**

- As amostras devem estar identificadas com as etiquetas emitidas na recepção, quando realizado o cadastro do paciente, etapa necessária para o rastreamento e emissão do laudo do paciente no sistema do HEMOAM (SoftLab e HEMOSYS).
- Será realizado cadastro no aparelho Alinity i- SCM 02 Ai01767, utilizando o número do pedido exibido na etiqueta da amostra do doador, escolha o tipo de amostra que está sendo utilizada para análise (soro), o lote do cartucho que está sendo utilizado na respectiva análise e o teste que será realizado (HTLV-1/2).
- Depois do cadastro no sistema do aparelho, a amostra deve ser inserida no mesmo, onde será analisada através do ensaio imunológico para a detecção qualitativa de anticorpos do vírus através da combinação da amostra e dos reagentes do ensaio.
- A reação está baseada na criação de um novo complexo onde está consiste de uma parte da amostra tratada previamente e de micropartículas paramagnéticas revestidas de HTLV 1-2, os anticorpos anti-HTLV contidos na amostra de pacientes infectados irão se ligar à micropartículas revestidas de peptídeo sintético de HTLV 1-2 e antígeno recombinante do HTLV-1.
- Posteriormente, será realizado a lavagem, onde os conjugados marcados com acridínio ligam-se aos anticorpos anti-HTLV 1-2, seguindo o ciclo de lavagem, a solução pré-ativadora é adicionada à mistura de reação, tendo

o resultado quimioluminescente dessa metodologia medido em unidades de luz relativa (ULR).

## 6. INTERPRETAÇÃO DE RESULTADO

- O ponto de corte é 1,00 S/CO.

<b>Resultados iniciais</b>		
<b>Resultado inicial (S/CO)</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Procedimento de Reteste</b>
< 1,00	Não reativo	Não é necessário reteste. Amostra considerada negativo para anticorpos para HTLV I e HTLV II.
≥ 1,00	Reativo	Reteste em duplicata.

<b>Interpretação final</b>		
<b>Resultado de novo teste (S/CO)</b>	<b>Resultados finais</b>	<b>Interpretação final</b>
Ambos os resultados < 1,00	Não reativo	Amostra considerada negativo para anticorpos para HTLV I e HTLV II.
Um ou ambos os resultados ≥ 1,00	Repetidamente Reativo	O espécime deve ser mais testado por suplementar métodos.

- Além disso, um possível resultado indeterminado pode ser observado, tendo os valores expressos entre 0,89 e 0,99 S/CO

## 6. ANEXOS

Não se aplica.

## 7. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

Não se aplica

## 8. REFERÊNCIAS

Bula do Kit Alinity's HTLV-1/2

#### 9.4. Teste de Western Blot com o kit HTLV-1/2 blot 2.4 - MPDiagnostics

##### 1. OBJETIVO

Descrever e padronizar os procedimentos e técnicas para realização do teste de *Western Blot* utilizando o kit HTLV BLOT 2.4 da marca MP DIAGNÓSTICS nas amostras do estudo: Validação do FC-Duplex HTLV-1/2 IgG diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2 no Hemocentro do Amazonas - HEMOAM.

##### 2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se aos colaboradores da pesquisa envolvidos no processo de realização do teste de *Western Blot* utilizando o kit HTLV BLOT 2.4 da marca MP DIAGNÓSTICS nas amostras de soro dos participantes do projeto em HTLV-1 e HTLV-2.

##### 3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

**HTLV:** vírus linfotrópico de células T humanas

**POP:** Procedimento Operacional Padronizado.

**HEMOAM:** Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

##### 4. RESPONSABILIDADES

A responsabilidade pela implantação e treinamento dos membros da equipe para a aplicação deste POP caberá ao pesquisador responsável do projeto de pesquisa ou a alguém da equipe do estudo por ele designado. A responsabilidade pelas atividades descritas neste POP é do pesquisador responsável do estudo e serão executadas pelos membros da equipe do estudo delegados para a realização delas.

##### 5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

5.1 Usando a pinça, retire cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e coloque-as em cada poço intercalada com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles Reativo Forte, Reativo Fraco e Não-Reativo.

**5.2 Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA em cada poço.**

**Obs:**Preparo da solução-tampão de lavagem diluída:

Dilua 1 volume de SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADA (20X) com 19 volumes de água de qualidade reagente (destilada ou MiliQ). Misture bem.

Exemplo: Para a realização do teste em 15 fitas (10 pacientes, 3 controles e 2 testes adicionais)deverá ser feito um cálculo, pensando que se terá 1 etapa de lavagem inicial e 2 etapas de lavagem com 3 repetições, usando 2mL para cada fita e etapa), então:

$15 \text{ fitas} \times (1 \text{ etapa inicial} \times 2\text{mL}) + (2 \text{ etapas} \times 3 \text{ repetições} \times 2\text{mL})=?$

$15 \text{ fitas} \times (2 \text{ mL} + 12 \text{ mL}) =?$

$15 \text{ fitas} \times 14 = 210 \text{ mL}$

Diluição:  $210/20 = 10,5\text{mL}$  da solução concentrada.

$210\text{mL} - 10,5\text{mL} = 199,5\text{mL}$  de H<sub>2</sub>O.

Ou seja: 10,5mL da solução concentrada + 199,5mL de H<sub>2</sub>O destilada ou MiliQ

**5.3** Incube as fitas durante pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 10 a 14 oscilações por minuto)Cubra a bandeja para evitar respingo. Após a incubação, remova a solução-tampão por aspiração.

**5.4Adicione 2 ml de SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING em cada poço.**

**Obs2:**Preparo da solução-tampão para blotting:

(a) Reconstitua cada frasco do TAMPÃO ESTOQUE LIOFILIZADO com 100 ml de água de qualidade reagente. Misture bem para dissolver. Esta SOLUÇÃO TAMPÃO ESTOQUE RECONSTITUÍDA mantém-se estável durante 6 semanas se conservada entre  $2^\circ\text{C}$  e  $8^\circ\text{C}$

(b) A SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING deve ser preparada logo antes do uso. Adicione 1g do conteúdo liofilizado (PÓ PARA BLOTTING) a cada 20 ml da SOLUÇÃO TAMPÃO ESTOQUE RECONSTITUÍDA, preparada na etapa 2(a) acima. Agite para dissolver completamente o pó.

(c) Agite novamente antes de aplicar.

Exemplo para a realização do teste em 15 fitas (10 pacientes, 3 controles e 2 testes adicionais):deverá ser feito um cálculo, pensando que se terá 2 etapas de uso Solução-Tampão para Blotting, usando 2mL para cada fita e etapa), então:

$$15 \text{ fitas} \times (2 \text{ etapas} \times 2\text{mL})=?$$

$$15 \text{ fitas} \times 4 \text{ mL} =60 \text{ mL}$$

**Obs2:Lembrar que para diluir** 1g de pó para blotting, deverá ser utilizado 20 mLda solução estoque reconstituída.

$$1\text{g} \text{ ----- } 20\text{mL}$$

$$X \text{ ----- } 60\text{mL}$$

**X= 3g do pó para blotting para diluir nos 60mL da solução estoque reconstituída**

**IMPORTANTE:**Na etapa 5.9 será utilizado novamente a **SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING** na diluição do conjugado, por isso foi realizado esse volume final.

**5.5** Adicione 20 µl de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados.

**5.6** Cubra a bandeja com a tampa fornecida e incube durante 1 hora à temperatura ambiente (25 ± 3°C) na plataforma oscilante.

**5.7** Retire cuidadosamente a tampa, evitando salpicos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiros de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada.

**5.8** Lave cada fita 3 vezes com 2 ml de **SOLUÇÃO-TAMPÃO DE LAVAGEM DILUÍDA** deixando-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem.

**5.9** Adicione 2 ml de **SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO** a cada poço.

**Obs3:PREPARO DA SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO**

Nota: Prepare a solução em um recipiente ou béquer de polipropileno ou Tubo Falcon de 50mL.

(a) A **SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO** deve ser preparada logo antes do uso.

(b) Prepare a **SOLUÇÃO DE CONJUGADO DE TRABALHO** diluindo o **CONJUGADO** a 1:1.000 em **SOLUÇÃO-TAMPÃO PARA BLOTTING**, por

exemplo, 10 µl de CONJUGADO para 10 ml de SOLUÇÃO TAMPÃO PARA BLOTTING.

Exemplo: Ao usar 15 fitas, fazer 30mL de tampão para blotting e diluir nele 30uL de conjugado.

**5.10** Cubra a bandeja e incube durante 1 hora à temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) na plataforma oscilante.

**5.11** Aspire o CONJUGADO dos poços. Lave como na etapa 5.8.

**5.12** Adicione 2 ml de SOLUÇÃO DE SUBSTRATO a cada poço.

**5.13** Cubra a bandeja e incube-a durante 15 minutos na plataforma oscilante.

**5.14** Aspire o SUBSTRATO e enxague as fitas pelo menos três vezes com água de qualidade reagente (destilada ou MiliQ) para interromper a reação.

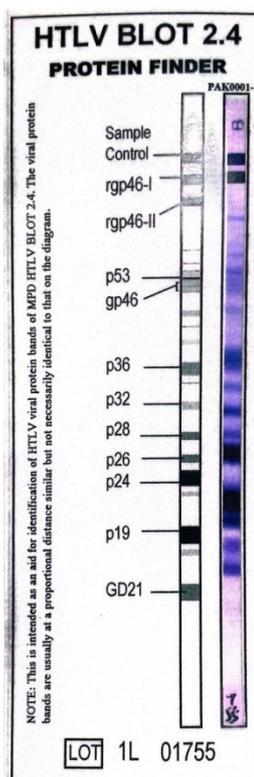
**5.15** Usando a pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja.

**5.16** Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas e interprete os resultados, como descrito no item 6. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

## 6. INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

**6.1** A interpretação dos resultados deverá seguir a distribuição das bandas de proteínas identificadas na fita do Western Blot (Figura 1).

**Figura 1:** Bandas de identificação das proteínas do HTLV-1/2 no teste Western Blot HTLV Blot 2.4.



**6.2** Além disso, após a identificação das bandas fortes em cada fita, que indicarão o resultado em: Soro Não Reagente (Negativo), Soro Reagente (Positivo) para HTLV-1, Soro Reagente (Positivo) HTLV-2, Soro Reagente (Positivo) HTLV\* e Soro Indeterminado\*\*. Para interpretar o resultado de cada fita, seguir de acordo com a tabela 1 abaixo:

**Tabela 1:** Interpretação do resultado do teste Western Blot HTLV Blot 2.4.

Soro Não Reagente (Negativo)	1. Nenhuma reatividade com proteínas específicas do HTLV.
Soro reativo para HTLV-I	2. Reatividade com moléculas codificadas pelo gene GAG (p19 com ou sem p24) e com duas codificadas por ENV (GD21 e rgp46-I).
Soro reativo para HTLV-II	3. Reatividade com moléculas codificadas pelo gene GAG (p24 com ou sem p19) e com duas ENV (GD21 e rgp46-II).
Soro reativo para HTLV*	4. Reatividade com moléculas codificadas pelo gene GAG (p19 e p24) e por ENV (GD21). - Soro reativo para HTLV-I indicado se $p19 \geq p24$ . - Soro reativo para HTLV-II indicado se $p19 < p24$
Soro indeterminado**	5. Detecção de bandas específicas para o HTLV, mas que não preenche os critérios de soropositividade para HTLV-I, HTLV-II ou HTLV. No entanto osseg padrões de bandeamento classificados como indeterminados podem ser interpretados como soronegativos: - Padrões de western blot com GAG do HTLV-I indeterminado (HGIP), existência de p19, p26, p28, p32, p36, p53, porém a ausência de p24 e de outras proteínas codificadas por ENV. - Quaisquer combinações de proteínas codificadas por GAG (p19, p26, p28

	p36, p53) porém ausência de p24 e de quaisquer proteínas codificadas por EN - Qualquer proteína de GAG sozinha (p19, p24, p26, p28, p32, p36 e p53)
--	--

\*Amostras soropositivas das quais não é possível fazer a tipagem podem ser melhor solucionadas usando o algoritmo de wiktoria et al na ausência de rgp46-I e de rgp46-II. Esse algoritmo usa a reatividade relativa de p19 e de p24 e mostrou-se eficiente para diferenciar os dois sorotipos.

\*\*A interpretação como indeterminado baseia-se nas diretrizes da OMS de 1990 no entanto vários estudos sugeriram que alguns padrões de bandas indeterminados (conforme indicado) podem ser interpretados como soronegativos, em especial provenientes de doadores de sangue sadios. Por exemplo, um estudo envolvendo 37.424 doadores de sangue sadios confirmou que HGIPs podem ser interpretado com segurança como sendo soronegativos. No entanto, deve-se ter cautela quanto os padrões indeterminados forem obtidos de usuários de drogas intravenosas ou de doadores de sangue de áreas endêmicas, assim como de pacientes com doenças neurológicas.

## **6. ANEXOS**

Não se aplica.

## **7. FORMULÁRIOS UTILIZADOS**

Não se aplica

## **8. REFERÊNCIAS**

Bula do Kit HTLV BLOT 2.4 - MP DIAGNOSTICS.