

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Karla Morais Silva

CONFECÇÃO E AMPLIAÇÃO DE PAINEL SOROLÓGICO PARA HTLV

Rio de Janeiro

2016

Karla Morais Silva

CONFECÇÃO E AMPLIAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO DE HTLV

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutora: Marisa Coelho Adati

Preceptora: Helena C. B. Guedes Borges

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Silva, Karla Morais

Confecção e ampliação do painel sorológico de HTLV / Karla Morais Silva – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

57 f.: il., tab.

Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Preceptora: Helena Cristina Baltazar Guedes Borges.

Tutora: Marisa Coelho Adati

1. Testes Sorológicos. 2. Kit de Reagentes para Diagnóstico. 3. Vírus 1 Linfotrópico T Humano. 4. Vírus 2 Linfotrópico T Humano. 5. Controle de Qualidade. I. Título

Karla Morais Silva

CONFECÇÃO E AMPLIAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO DE HTLV

Trabalho de conclusão do curso apresentado ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Álvaro da Silva Ribeiro (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lúcia Maria Corrêa Werneck (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Helena Cristina Baltazar Guedes Borges - Preceptora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Marisa Coelho Adati - Tutora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a todas as pessoas
que me ajudaram a fazer parte da
Fiocruz.

Agradecimentos

Agradeço a Deus primeiramente pela oportunidade concedida de trabalhar na área que escolhi me formar.

Agradeço minha família que sempre me apoiou e entendeu as inúmeras vezes que precisei estar ausente. Em especial a minha irmã Maria, pela cumplicidade e companheirismo nesses dois anos. Obrigada pelo meu “bebê”!!!

A minha amiga Danieli Cunha, afinal foi “por causa dela” que tudo isso começou...da prova de seleção até a monografia, sempre presente, obrigada!

Marcio e Alcides por entenderem minha escolha e principalmente por terem me ajudado nesses dois anos, na adaptação de uma rotina que sempre senti muita falta! Obrigada meninos.

Bibiana Pizarro pelo apoio e carinho de anos, sempre presente, fazendo-me ver o mundo de uma forma melhor.

Solange Cunha (mama) por ter sido realmente uma mãe! Amiga para todas as horas, incentivadora de tantas coisas boas que aconteceram comigo! Obrigada por ter cruzado meu caminho e feito meus dias mais alegres e divertidos! Adriana Dayse, amiga que ganhei e que a cada dia agradeço por ter aparecido na minha vida, acrescentando conhecimento e diversão nesses anos de caminhada. Sucesso para nós ragazza!

Jéssica Avante, Juliana Barreto, Nath Fernandes com Pedrito, vocês foram incrivelmente incríveis. Obrigada pela amizade, pela companhia, pelas risadas e pelas lágrimas.

Bruno Madeira, meu playboy predileto! Obrigada pelos ouvidos, pela arte, pela cerva, pelas conversas, pelas risadas, pelos ensinamentos, pelos conselhos... faltou mais alguma coisa?

Ao pessoal do LSH, Margareth, Marli, Dani, Vanderlei, Roberto, Valéria, pelo ensinamento e paciência nesses dois anos. Renato e Jorge por terem me “obrigado” a aprender forçadamente libras.

A Marisa pela simplicidade em passar todo seu conhecimento e experiência.

A Helena “chefia” sempre online e sempre presente para tirar dúvidas.

A Álvaro pelos ensinamentos nesse período de caminhada.

Dani Vigo, pessoinha “na dela” e que aos poucos fui conquistando e que passei a ter um carinho especial e que hoje além dos ensinamentos nesses dois anos, levo a amizade sincera e o carinho.

Sabrina Alberti, a pessoa com que a afinidade logo bateu e que além de todas as dúvidas, os ensinamentos, as broncas, tornou-se uma amiga para além da Fiocruz.

Cris, Joice, Marlon, Nath, Paola e Rafa, residentes sem igual. Nada seria igual sem vocês, obrigada pelas fotos, pela diversão, pelas risadas, pela alegria de viver. Rafita, em especial te agradeço por toda a ajuda, do início da residência até o final, sempre prestativa, sempre presente, sempre pronta para ajudar...

A todos que tive o prazer em conhecer e conviver nesses dois anos de residência, Rosane, Gisele Custódio, Katia Leandro, Jéssica, Antônio (obrigada pelo meu ló), Geralda pelo café de cada dia, Dalva e Clara pelo sorriso diário. Gi, obrigada por todos os bons dias e pelo incentivo de sempre, por ter sempre um sorriso no rosto e um atendimento de primeira. Fica a saudade, mas levo a amizade e o prazer de ter podido conviver contigo!

As residentes que conheci e convivi por rápidos dois anos. Desculpe às vezes a sinceridade excessiva, sou assim mesmo... mas, gosto e torço muito por todas! Um bj especial para Amanda, Gi e Mayara.

Geni, Samira, Lud, Thais e Tamillys, por fazer meus dias mais felizes com a companhia, com as risadas, dividindo alegrias e tensões... mas sempre unidas e fortes independente de qualquer coisa!!

Ao meu “mio” Cáesar Rômulo, por estar ao meu lado nesse finalzinho de ano, me apoiando mesmo que de longe em finalizar meu trabalho, me fazendo acreditar que tudo iria dar certo.... e deu, viu?! Obrigada por fazer parte dessa loucura comigo desde o início e por me incentivar a sempre querer mais.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki

RESUMO

A verificação da qualidade dos kits de diagnóstico para detecção do HTLV-I/II é essencial, uma vez que são utilizados tanto em rotinas laboratoriais como em Serviços de Hemoterapia para aprovar a doação de sangue. Os conjuntos diagnósticos constituem uma ferramenta fundamental para diagnóstico por possuírem uma alta sensibilidade e especificidade, garantindo a confiabilidade dos resultados. Pela variedade de conjuntos diagnósticos encontrados no mercado, é necessário um rigoroso controle de qualidade para evitar possíveis erros analíticos como resultados falso-positivos, causando problemas emocionais e sociais no doador. O presente trabalho foi realizado no intuito de caracterizar unidades de plasma obtidas de Serviços de Hemoterapia de diversas regiões do país para compor e ampliar um painel de referência para HTLV que será utilizado na verificação do controle de qualidade dos kits de diagnóstico para o HTLV-I/II, aumentando a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), localizado no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)/Fiocruz. Desta forma, foram analisadas no período de 2000 a 2013, 3.559 unidades de plasma. Das unidades que foram encaminhadas para o INCQS, 109 foram enviadas como reagentes para HTLV, sendo recharacterizadas pela triagem de marcadores para HIV-1/2, hepatite C, HBsAg, anti-HBc, Doença de Chagas e Sífilis. A princípio foram realizados dois testes para HTLV-I/II. As unidades de plasma com reatividade apenas para anti-HTLV-I/II foram testadas através da técnica de ELISA e nas amostras com resultado reativo, a confirmação foi realizada por *Western Blot*. Todos os testes realizados seguiram rigorosamente as técnicas descritas nos manuais de instrução de cada fabricante. Por fim, foram obtidas 76 amostras com reatividade para anti-HTLV-I/II, possibilitando a ampliação do painel de referência já existente no LSH e conseqüentemente a capacidade analítica do laboratório.

Palavras-Chaves: HTLV, Painel sorológico, Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

The quality verification of diagnostic kits for the detection of HTLV-I/II is essential, since they are used both in laboratory routines as in Hematology Services to approve blood donation. The kits are a key tool for diagnosis due to a high sensitivity and specificity, ensuring the results reliability. The variety of sets diagnoses found in the market, required a strict quality control to avoid possible analytical errors such as false positive results, leading to emotional and social problems in the donor. This study was conducted in order to characterize plasma units obtained from Hemotherapy Services from different Brazilian regions to compose and expand a reference panel for HTLV to evaluate the quality control of diagnostic kits for HTLV-I/II, increasing the analytical capacity of the Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH), located at the National Institute of Quality Control in health (INCQS)/Fiocruz. Thus, 3.559 plasma units were analyzed from 2000 to 2013. The units sent to INCQS, 109 were reagents for HTLV, and were characterized by screening markers for HIV-1/2, HCV, HBsAg, anti-HBc, Chagas disease and syphilis. At first there were two tests for HTLV-I / II. The plasma units with reactivity only to the anti-HTLV-I/ II were tested by ELISA and in samples with reactive result, confirmation was carried out by Western blot. All tests followed strictly the techniques described in the instruction manuals of each manufacturer. Finally, 76 samples were obtained for reactivity with HTLV-I / II, enabling the expansion of the already existing reference panel of LSH and consequently the ability of the analytical laboratory.

Key-Words: HTLV, serological Panel, Health Surveillance

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
D.O.	Densidade Ótica
DNA	Ácido Desoxirribonúcleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático em fase sólida
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrófico das Células T Humanas
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LSH	Laboratório de Sangue e Hemoderivados
LTR	Repetições Longas Terminais
L/LTA	Leucemia/Linfoma de Células T do adulto
mL	Mililitro
MS	Ministério da Saúde
ORF	Janela Aberta de Leitura
PET/MAH	Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao HTLV
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonúcleico
RNA _t	RNA Transportador
RNA _{se}	Ribonuclease

SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio
VDRL	<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>
WB	<i>Western Blot</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação Esquemática do Vírus do HTLV-I/II.....	17
Figura 2	Ciclo de Replicação Viral do HTLV.....	19
Figura 3	Representação Esquemática do ELISA indireto.....	25
Figura 4	Representação Esquemática da Imunofluorescência.....	27
Figura 5	Representação Esquemática da Técnica de <i>Western Blot</i>	28
Figura 6	Obtenção das Unidades de Plasma.....	33
Figura 7	Modelo de Cadastro das Unidades de Plasma no Caderno de Cadastro.....	34
Figura 8	Esquema de Processamento das Unidades de Plasma.....	35
Figura 9	Esquema para Caracterização das Unidades de Plasma.....	37
Quadro 1	Conjuntos Diagnósticos Utilizados na Confirmação e Caracterização Sorológica das Amostras Obtidas de Unidades de Plasma.....	38
Quadro 2	Proteínas do HTLV e Critério de Interpretação do Teste de <i>Western Blot</i>	39
Quadro 3	Critérios de Interpretação do <i>Western Blot</i> anti-HTLV.....	40
Gráfico 1	Quantitativo Total de Amostras Recebidas.....	41
Gráfico 2	Origem das Unidades de Plasmas Recebidas.....	42
Gráfico 3	Seleção das Amostras.....	42
Gráfico 4	Resultados dos ELISAs para Detecção de Anticorpos.....	43
Gráfico 5	Resultados Obtidos na Técnica de <i>Western Blot</i>	44
Gráfico 6	Distribuição da Freqüência de Aparecimento das Bandas na Técnica de <i>Western Blot</i>	45

Gráfico 7	Total de Amostras Reagentes e Não-Reagentes.....	46
-----------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	HISTÓRICO.....	15
1.2	O VÍRUS DO HTLV.....	16
1.3	A ESTRUTURA VIRAL E O GENOMA DO HTLV.....	17
1.4	VIAS DE TRANSMISSÃO.....	19
1.4.1	Transmissão Parenteral.....	20
1.4.2	Transmissão Sexual.....	20
1.4.3	Transmissão Vertical.....	20
1.5	EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.6	DIAGNÓSTICO.....	22
1.6.1	ELISA.....	24
1.6.2	Quimioluminescência.....	25
1.7	TESTES CONFIRMATÓRIOS.....	26
1.7.1	Imunofluorescência.....	26
1.7.2	<i>Western Blot</i>	27
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVO.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	AMOSTRAS.....	32

4.2	RECEBIMENTO, CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA.....	33
4.3	PROCESSAMENTO DAS UNIDADES DE PLASMA.....	34
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA.....	35
4.5	TESTES SOROLÓGICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL.....	38
4.5.1	Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....	38
4.5.2	<i>Western Blot</i>	39
5	RESULTADOS.....	41
5.1	DA QUANTIDADE DE UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS	41
5.2	DA ORIGEM DAS UNIDADES DE PLASMA.....	41
5.3	DA SELEÇÃO DAS AMOSTRAS POR VOLUME.....	42
5.4	DOS RESULTADOS SOROLÓGICOS OBTIDOS.....	43
5.5	<i>WESTERN BLOT</i>	44
5.6	QUANTITATIVO DE AMOSTRAS VERDADEIRO-POSITIVAS PARA HTLV.....	45
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Os retrovírus foram descritos há quase um século e estão entre os primeiros vírus descobertos pela ciência. Diversas características dos retrovírus foram conhecidas nos anos de 1960 e 1970, como a enzima transcriptase reversa e oncogenes celulares (CATALAN-SOARES et al, 2001).

O primeiro agente da família retrovírus a ser isolado em células humanas na década de 1980 foi o Vírus Linfotrópico das Células T humanas - HTLV. O HTLV-I foi descoberto nos Estados Unidos em 1980 por Poiesz et al, em linfócitos de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Já o HTLV-II foi descrito em 1982 por Kalyanaraman et al, em células esplênicas de um paciente que desenvolveu variante de células T (VERONESI; FOCACCIA, 2009). Em 2005 foram descobertos em populações da África Central dois novos tipos: o HTLV-III e IV, porém não se sabe dizer se estes dois subtipos do vírus transmitem doenças e a sua forma de transmissão (CHAMPS, 2010; PINTO, 2011).

O HTLV-I é o subtipo mais associado a doenças como a Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao HTLV (PET/MAH) que é uma complicação crônica e progressiva que gera um processo inflamatório medular, assim como a Leucemia/Linfoma de Células T do adulto (L/LTA) (CHISSUMBA et al, 2015; SEGURADO, 2013). A literatura recente descreve o HTLV-II associado a casos de mielopatias crônicas, idênticos aos de PET/MAH, o que mostra sua potencialidade neuropatogênica (ROCHA et al, 2007; SEGURADO, 2013).

O HTLV-I e o HTLV-II possuem características biológicas semelhantes e sua particularidade é seu tropismo por linfócitos T, porém o HTLV-I tem maior afinidade por linfócitos T CD4+, enquanto o HTLV-II por linfócitos T CD8+ e seus efeitos hematológicos são distintos (MORATO, 2012).

Há várias manifestações clínicas relacionadas com a infecção pelo HTLV: síndromes inflamatórias como uveíte, polimiosite, artropatias, síndrome de Sjögren e dermatopatias, como a dermatite infecciosa e a ictiose adquirida. Embora a maioria dos pacientes infectados apresenta-se assintomático ao longo da vida, cerca de 1 a 4% dos indivíduos contaminados pelo HTLV adoecem por causa da infecção (PINTO, 2011; SEGURADO, 2013).

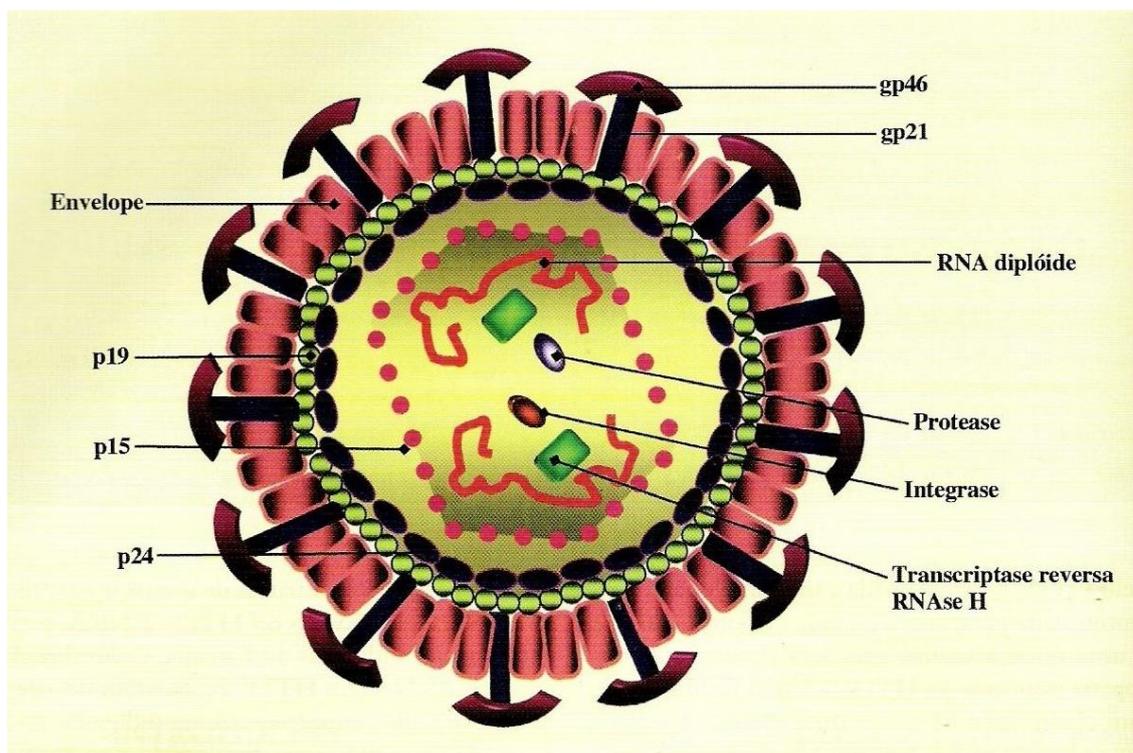
O vírus do HTLV-I é cosmopolita estando presente em todos os continentes, com prevalência em áreas como o Japão, África, parte da Ásia e América Central do Sul. Já o HTLV-II mostra-se um vírus predominante no Ocidente. No Brasil é considerado endêmico e estima-se que 2,5 milhões de pessoas sejam portadoras do HTLV-I no país, com predomínio na região Nordeste (GLÓRIA et al, 2015; SODRÉ et al, 2010).

1.2 O VÍRUS DO HTLV

O HTLV é denominado retrovírus do tipo C, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus* (CABRAL, 2010). O HTLV encontra-se na família *Retroviridae* devido às suas homologias estruturais e sequências genéticas que o diferencia dos outros vírus por ser o único a possuir polaridade positiva (TAMEGÃO-LOPES et al, 2006). O vírus é constituído do vírion que possui 9032 nucleotídeos e partículas esféricas com 100 nanômetros de diâmetro que são constituídas de envelope externo glicoprotéico e região central ou *core* (FIGURA 1). A porção principal do vírion possui duas cópias de RNA com uma única fita, proteínas da matriz viral, capsídeo protéico e enzima transcriptase reserva (MARTINS et al, 2011; SEGURADO, 2013). O HTLV-I/II possuem semelhança em 60% de sua estrutura, porém são distintos principalmente no gene pX. O subtipo HTLV-I é subdividido em A ou Transcontinental, que é encontrado mundialmente; B ou Japonês que predomina no Japão; C localizado no oeste da África e Caribe; e o D que foi descrito no norte da África. O HTLV-II possui três subtipos: HTLV-2a conhecido também como HTLV-2 Mo que prevalece entre usuários de

drogas injetáveis que vivem na América do Norte; HTLV-2b ou HTLV-2 NRA que predomina entre grupos indígenas da Argentina, América do Norte, Colômbia e Panamá e HTLV-2c que tem sido visto em populações indígenas do Brasil e na região urbana (ROMANOS et al, 2015).

Figura 1 – Representação esquemática do vírus do HTLV-I/II.



fonte: (Morato, 2012)

1.3 A ESTRUTURA VIRAL E O GENOMA DO HTLV

O HTLV-I/II são constituídos de capsídeo icosaédrico e proteínas codificadas pelo gene *gag* que compõe o núcleo da partícula viral. No interior há duas subunidades similares de RNA de fita simples com sentido positivo, que constituem complexos com o RNA transportador (RNAt) e a transcriptase reversa (MONTANHEIRO, 2007; LOUREIRO, 2008; CABRAL, 2010).

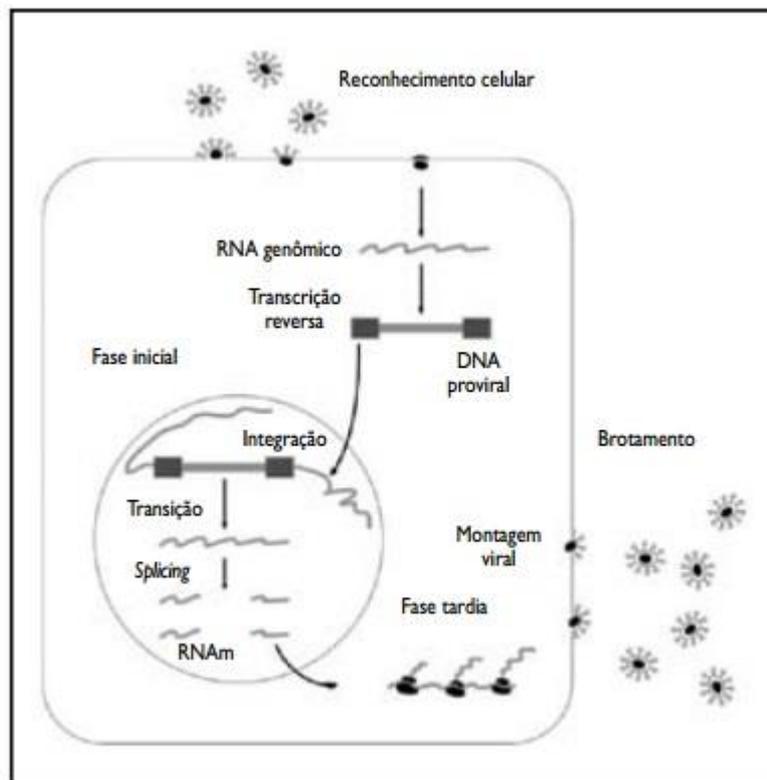
O *core* é composto por três proteínas (p15, p19 e p24), um envelope glicoprotéico que é composto por duas proteínas subunitárias (p21 e gp46) e por enzimas fundamentais para o ciclo de replicação viral como a integrase, protease, transcriptase reversa e o genoma (ROMANOS et al, 2015). O genoma proviral possui vários genes que são divididos em estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e regulatórios (*tax* e *rex*). O gene *pol* codifica as enzimas integrase, transcriptase reversa e RNase; o gene *gag* codifica proteínas do *core* e o *env* codifica proteínas do envelope viral. A glicoproteína gp21 serve como alicerce para a proteína de superfície gp46 e juntamente à membrana lipídica localiza-se a proteína da matriz. Dentro das partículas virais estão presentes as enzimas codificadas pelo vírus, o genoma, a transcriptase reversa, a integrase e a RNase.

O vírus também possui uma região chamada de região X, aonde encontram-se os genes reguladores *tax* (tradutor) e *rex* (regulador de expressão). Os dois genes regulam a expressão das proteínas reguladoras que possuem o mesmo nome, assim como a ativação da replicação viral. O HTLV possui também uma região chamada de pX, que apresenta quatro regiões abertas de leitura codificadoras de proteínas como as reguladoras *tax* e *rex* e outras proteínas com função não definidas. O genoma viral possui ainda duas regiões nas extremidades, chamadas LTR, que são sequências repetitivas, sem função de codificação (MACHADO et al, 2003; BRASIL, 2004; MARTINS et al, 2011).

O ciclo de vida do HTLV necessita da enzima transcriptase reversa. A replicação começa com a adsorção dos vírus por uma via específica por meio de receptores da membrana plasmática da célula com a ajuda das glicoproteínas de superfície e, em seguida a entrada do vírus na célula (penetração), ocorre por fusão do envelope com a membrana celular ou por endocitose. Em seguida ocorre o desnudamento com a liberação do material genético viral no citoplasma da célula hospedeira e o processo de transcrição do genoma. A fita simples de RNA viral é transcrita à DNA de fita dupla pela transcriptase reversa da fita de DNA, vai para o núcleo e unifica-se ao genoma do hospedeiro pela ação de uma integrase viral. Parte do RNA viral que é sintetizado é processado e gera o RNA mensageiro (RNAm) que é traduzido

nas proteínas virais adequadas no citoplasma. Por último o *core* viral é preparado e o vírus liberado da superfície celular (FIGURA 2) (LOPES, 2006; MENDONÇA, 2012).

Figura 2 – Ciclo de Replicação Viral do HTLV.



fonte: (Santos e Lima, 2005)

1.4 VIAS DE TRANSMISSÃO

O HTLV-I/II pode ser transmitido por via parenteral, sexual e vertical (HEMORIO, 2014). Já as formas de transmissão do HTLV-III/IV ainda não são conhecidas (LOPES, 2006).

1.4.1 Transmissão Parenteral

A transmissão por via parenteral pode ocorrer pela transfusão de sangue e hemoderivados celulares, transplantes, contato percutâneo com secreções biológicas ou sangue principalmente em profissionais da área de saúde e exposição a componentes sanguíneos contaminados (concentrado de hemácias, leucócitos e plaquetas) (BARMPAS et al, 2014). O risco aproximado para a contaminação pelo vírus através da transfusão é de 60% (SEGURADO, 2013). Os usuários de droga também estão incluídos neste grupo por seu comportamento de risco e por isso, tornam-se possíveis transmissores de retrovírus humanos através da troca de agulhas entre pessoas saudáveis e contaminadas e objetos perfuro-cortantes contaminados (MENDONÇA, 2012).

1.4.2 Transmissão Sexual

A transmissão por contato sexual dá-se por meio de células no sêmen infectadas e ocorre com maior prevalência do homem para a mulher, observando uma taxa de 60,8% e incomum da mulher para o homem, ocorrendo apenas em 0,4% dos casos (FIGUEIRÓ-FILHO et al, 2005; LOPES, 2006). O comportamento de risco entre os homossexuais do sexo masculino está relacionado ao número de parceiros e a duração do relacionamento (LOPES; PROIETTI, 2008).

1.4.3 Transmissão Vertical

A transmissão vertical ocorre da mãe infectada para seu filho e geralmente acontece pelo aleitamento materno (LOPES; PROIETTI, 2008). Ela ocorre em torno de 20% dos filhos de mães contaminadas, sendo o principal meio de contaminação o aleitamento materno duradouro, pois no leite há

presença de linfócitos contaminados. A transmissão vertical está ligada também a elevada carga pró-viral materna e altos títulos de anticorpos. A transmissão perinatal ou intrauterina é rara, mas de 2,5 a 5% dos filhos de mulheres contaminadas serão infectados, mesmo não havendo o aleitamento materno (BARMPAS et al, 2014).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

Acredita-se que existam de 15 a 20 milhões pessoas infectadas, a maior parte pelo HTLV-I. A maioria dos indivíduos contaminados pelo vírus não apresenta sintomas, porém de 5 a 10% das pessoas que são infectadas desenvolvem doenças associadas ao HTLV (PAIS-CORREIA et al, 2010; ROMANELLI et al, 2010). As áreas que são consideradas endêmicas para o HTLV-I são Japão, Ilhas do Caribe, América do Sul, África Equatorial e Melanésia. O HTLV-II predomina em usuários de drogas dos EUA e entre indígenas de vários países como Argentina e Colômbia. No Brasil, prevalece em todo território os dois tipos de vírus (CATALAN-SOARES et al, 2001; CHAMPS, 2010). O país com a maior prevalência do vírus no mundo é o Japão, atingindo a taxa de 20% dos habitantes. Países como Jamaica, Guiné e Peru também apresentam altos níveis de infecção (OLIVEIRA et al, 2014).

A infecção pelo HTLV é caracterizada por variação das taxas de prevalência dentro de áreas endêmicas; agrupamento da infecção; prevalência em mulheres com mais de 40 anos e elevado índice de soroprevalência com a idade. A infecção tem período latente longo e que pode se estender por décadas ou durante toda a vida da pessoa infectada (MENDONÇA, 2012). A prevalência do HTLV-I varia de acordo com idade, sexo e situação econômica na maioria das áreas endêmicas. Entretanto a prevalência entre os doadores de sangue pode não ser útil, pois nem sempre são fornecidos os melhores dados para estimar com precisão a prevalência de HTLV-I em um determinado país (ECDC, 2015).

Na Europa e nos Estados Unidos, a soroprevalência do HTLV-I é menor que 1%, porém o risco sobe para 20% em usuários de drogas injetáveis (JABBOUR et al, 2011). Na América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia e Peru), nota-se um índice de 2% de soropositividade a partir de estudos em doadores de sangue (ROMANELLI et al, 2010).

No Brasil, o HTLV-I foi descrito pela primeira vez em 1986, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul entre imigrantes japoneses provenientes de Okinawa. O HTLV-I está descrito em diversas regiões no país e a maior prevalência do vírus é na Bahia, na cidade de Salvador, que apresenta índices de quase 2% da população, seguido por Recife e Rio de Janeiro com 0,33%, Belo Horizonte apresentando 0,32%, São Paulo com 0,15%, Florianópolis e Manaus com 0,08%, apresentando assim uma soropositividade total de 0,46%; valor superior ao encontrado nos Estados Unidos, que é de 0,025%. As mulheres se mostram mais expostas ao vírus e tem sido observado um aumento da soroprevalência com a idade, geralmente depois dos 50 anos (GALVÃO-CASTRO et al, 2009; MOXOTO et al, 2007; LOPES; PROIETTI, 2008; GRASSI et al, 2011). O HTLV-II é endêmico em populações indígenas nativas das Américas, entre índios Kaiapós, por exemplo, que habitam a Região Norte brasileira. A prevalência do tipo II contempla 42% entre filhos de mães reagentes (BRASIL, 2013).

1.6 DIAGNÓSTICO

Nos anos 1980, o Japão foi o primeiro país a inserir a triagem para o HTLV para doação de sangue. Logo depois, em 1988, o FDA (Food and Drug Administration) sugeriu que fizesse a triagem sorológica em todos os doadores voluntários nos Estados Unidos, no Canadá começou em 1989 e na França em 1991. Suécia e Dinamarca iniciaram a triagem em 1994, posteriormente Grécia e Portugal também a adotaram. Países que apresentam baixa prevalência do vírus vem discutindo nas últimas décadas a relação custo/benefício da implantação da triagem sorológica para o vírus. Inglaterra e o País de Gales a

implantaram em agosto de 2002 e a Escócia em novembro do mesmo ano começou a triagem rotineira em mini-pools (mistura de plasmas de doadores). No Brasil, no ano de 1993, a portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993 tornou obrigatória a triagem sorológica para o HTLV-I/II. A portaria foi revogada e a Resolução RDC 57 de 16 de dezembro de 2010 veio substituí-la. Atualmente prevalece a Resolução RDC 34 de 11 de junho de 2014 (LOPES; PROIETTI, 2008; MENDONÇA, 2012; BRASIL, 2014).

Os métodos de diagnóstico empregados para a detecção da infecção pelo HTLV-I/II são os ensaios sorológicos, principalmente os que buscam anticorpos anti HTLV-I e II. Os primeiros testes utilizavam somente antígenos do HTLV-I. Por causa da grande semelhança genética entre o HTLV-I e o HTLV-II, os anticorpos anti-HTLV-II foram encontrados em 70% dos casos das infecções. Foram produzidos nas últimas décadas, testes combinados que detectam anticorpos contra o HTLV-I/II. Esses testes usam antígenos recombinantes provenientes da sequência genética específica do HTLV-I e do HTLV-II (BRASIL, 2004; ECDC, 2015).

As técnicas mais utilizadas para detecção de anticorpos anti-HTLV são: Aglutinação de partículas de látex, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), IFI (Imunofluorescência indireta), Quimioluminescência e *Western Blot* (WB). Para que haja uma escolha adequada da técnica para reação sorológica, indicadores como especificidade, sensibilidade e valores preditivos precisam ser analisados. A especificidade é a capacidade de um teste determinar verdadeiramente indivíduos que não são portadores da doença. Já a sensibilidade é a capacidade de um teste determinar verdadeiramente indivíduos que são portadores da doença. O valor preditivo positivo é a possibilidade das pessoas serem consideradas pelo exame como reagentes e realmente terem a doença e a possibilidade de uma pessoa não ter a doença uma vez que seu exame mostrou um resultado negativo é chamado de valor preditivo negativo.

Avaliando sensibilidade e especificidade, o melhor seria agrupar 100% de sensibilidade e especificidade. Como não é algo possível, na triagem de doadores de sangue opta-se por um teste que possa garantir maior

sensibilidade, devido às implicações que um teste falso-negativo pode trazer para o receptor. Já em caso de resultado falso-positivo, o sangue coletado será descartado e o serviço de hemoterapia deve prestar esclarecimento apropriado ao doador, dirigindo-o para confirmação e/ou tratamento, se aplicável.

No teste de ELISA, a sensibilidade para detectar anticorpos contra o HTLV-I varia de 97,3% a 100% e a especificidade entre 99,8% e 99,9%. Já no HTLV-II a sensibilidade dos testes de aglutinação de partículas ou ELISA fica em torno de 55% a 91%. A técnica de ELISA é vastamente utilizada como teste de triagem para HTLV-I e para HTLV-II em doadores de sangue, contudo na fase inicial de soroconversão é limitada. A infecção em estágio inicial impossibilita o teste de triagem de detectar a presença do vírus, o que é chamado de janela imunológica. A soroconversão em indivíduos infectados pelo HTLV pode acontecer anos após a infecção e ainda há pacientes que desenvolvem anticorpos anti-HTLV em baixa concentração, o que torna difícil sua detecção pelos testes sorológicos convencionais (BRASIL, 2004; SANTOS; LIMA, 2005; LOPES, 2006; LOPES; PROIETTI, 2008).

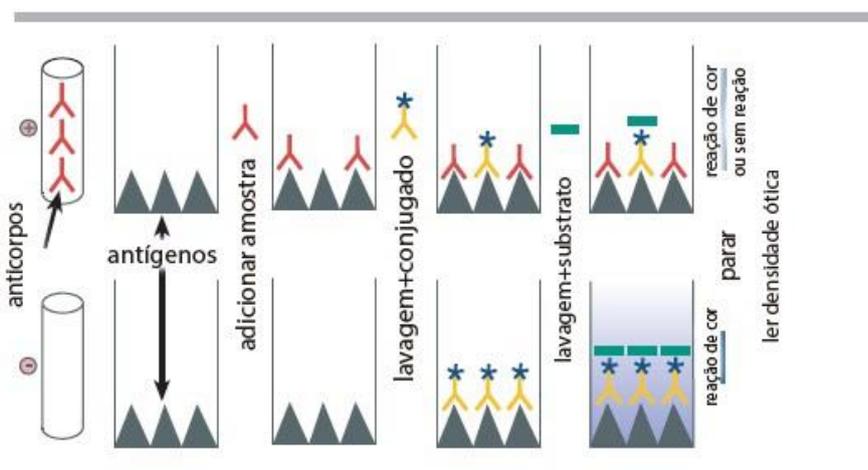
O teste confirmatório mais utilizado para confirmação do diagnóstico de HTLV é o *Western Blot*, que se caracteriza por teste qualitativo que detecta anticorpos presentes no plasma ou soro contra antígenos virais obtidos por meio de separação e transferência eletroforética (LOPES, 2006). Já o teste de imunofluorescência baseia-se na visualização de antígenos, utilizando anticorpos específicos marcados com um fluorocromo, que geralmente são a fluoresceína e a rodamina (SEGURADO, 2013).

1.6.1 ELISA

O termo ELISA foi usado pela primeira vez em 1971 e engloba testes heterogêneos distintos das metodologias enzimáticas usadas na época. É o teste mais utilizado para detecção de anticorpos anti-HTLV-I/II e é usado na triagem de doadores por ter um custo baixo, apresentar alta sensibilidade e

especificidade, facilidade de automação, elevada confiabilidade, rapidez no processamento com formato que permite analisar um grande número de amostras. O ensaio mais utilizado é o ELISA indireto que utiliza antígenos unidos à fase sólida, podendo ser detectados por um anticorpo complementar marcado com uma enzima capaz de reagir com um substrato cromogênico (FIGURA 3). O produto final mostra-se colorido pela presença de anticorpos e sua intensidade é medida por espectrofotômetro com comprimento de onda indicado pelo fabricante do produto. A intensidade da coloração é proporcional à presença de anticorpos na amostra (BRASIL, 1998; RIBEIRO, 2006; SEGURADO, 2013).

Figura 3 – Representação esquemática do ELISA indireto



fonte: (ELISA Technical Guide, 2013)

1.6.2 Quimioluminescência

O teste de quimioluminescência baseia-se na obtenção de energia por meio de uma reação química. Na reação, a energia gerada como resultado do rompimento de ligações fracas produz compostos em um estado eletronicamente excitado e assim que retorna ao estado de energia inicial, emitem luz. As vantagens desta técnica são a elevada sensibilidade de detecção; é um teste rápido; o baixo custo; a utilização de substâncias não-

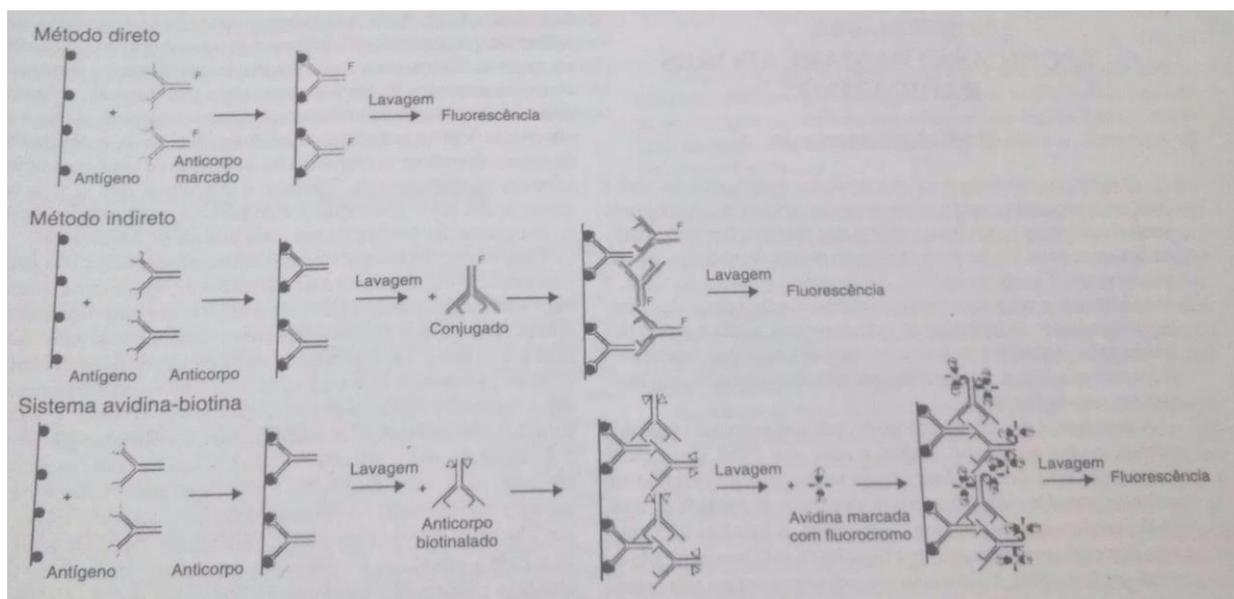
perigosas e de procedimentos práticos; a possibilidade de elevar a sensibilidade com a inclusão de compostos amplificadores do sinal luminoso e reações em cascata com mais de uma enzima e de um substrato e ainda possibilidade de aplicação em sistemas automatizados (SEGURADO, 2013).

1.7 TESTES CONFIRMATÓRIOS

1.7.1 Imunofluorescência

O teste de imunofluorescência é bastante utilizado no diagnóstico laboratorial para a pesquisa de anticorpos. O teste foi desenvolvido em 1941 e fundamenta-se na capacidade das moléculas de anticorpo unirem-se covalentemente a fluorocromos sem perder a reatividade específica com o antígeno. Existem dois tipos de teste: a imunofluorescência direta (IFD) e imunofluorescência indireta (IFI). A IFD é utilizada para pesquisa e identificação de antígenos em tecidos ou células por meio de um anticorpo específico marcado com um fluorocromo (conjugado). A metodologia apresenta alta especificidade e sensibilidade, porém é necessário o preparo de um conjugado para cada sistema que for estudar. A IFI pode ser utilizada na pesquisa de anticorpos ou antígenos, conforme FIGURA 4. A técnica é baseada em antígenos padronizados fixados em uma lâmina de vidro. A amostra de plasma ou soro é diluída, colocada sobre o antígeno e incubada para que haja a formação do antígeno-anticorpo. Depois das lavagens, a preparação é incubada com o conjugado (fluoresceína ligado a anti-imunoglobulina) reage com o anticorpo específico para o antígeno. A reação é visualizada por meio de microscopia de fluorescência. O método da IFI é mais vantajoso por ser mais sensível devido ao anticorpo não-marcado possuir mais sítios de ligação que o antígeno; podendo-se utilizar apenas um conjugado para sistemas distintos (MENDONÇA 2012; SEGURADO, 2013).

Figura 4 – Representação esquemática da Imunofluorescência



fonte: (Ferreira & Ávila, 2013)

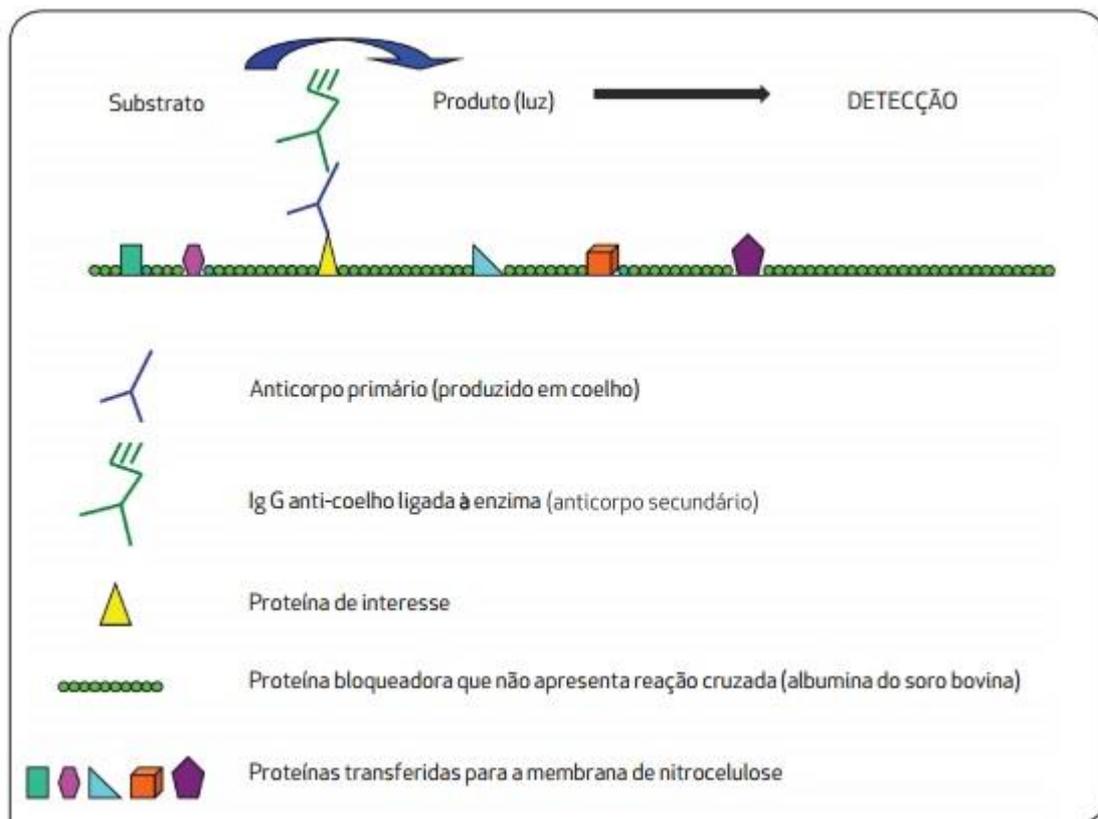
1.7.2 Western Blot

Uma das metodologias mais utilizadas na última década para identificar glicoproteínas específicas e proteínas reconhecidas por anticorpos é o *Western Blot*. Entre os testes sorológicos confirmatórios é o mais utilizado e capaz de detectar anticorpos presentes no plasma ou soro sendo considerado o “padrão ouro” para a confirmação do resultado reativo na triagem. Porém seu custo é alto, mas possui elevada especificidade e sensibilidade, além de conseguir diferenciar o vírus HTLV-I do HTLV-II. O método baseia-se na separação das proteínas de acordo com seu peso molecular, por eletroforese em gel de poli-acrilamida, possuindo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Estas são transferidas eletroforéticamente do gel para uma membrana de nitrocelulose onde ficam fixadas como uma réplica do padrão de bandas de gel. Depois do bloqueio da membrana para evitar reações inespecíficas, é realizada a identificação imunológica das frações do vírus transferidas e separadas. As tiras são incubadas em solução que possui anticorpos específicos para as frações. Os anticorpos unem-se aos antígenos que estão

fixados e, após a incubação da membrana em solução contendo antiimunoglobulina marcada com a enzima, a reação é revelada pela adição de cromógeno que dá origem a um precipitado com cor. Na confirmação do HTLV-I/II, é necessária a presença de reatividade das bandas p19 e/ou p24 (proteínas do *gag*), gp46, rgp46I ou rgp46II e gd21 (para o antígeno do envelope viral do HTLV-I e II) (LOPES, 2006; SEGURADO, 2013).

Figura 5 – Representação esquemática da Técnica de *Western Blot*



fonte: (Fiocruz, 2013)

2 JUSTIFICATIVA

Os testes que detectam anticorpos anti-HTLV I/II devem possuir alta sensibilidade (100%) e especificidade (> ou = a 99,5%) a fim de impedir a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos, respectivamente. Resultados falso-negativos trazem risco sanitário, constituindo agravo à saúde. Resultados falso-positivos expressam prejuízo social ao doador.

A segurança e confiabilidade dos testes para diagnóstico sorológico do HTLV dependem, entre outros parâmetros, da sua sensibilidade e especificidade.

A diversidade dos conjuntos para diagnóstico empregados na triagem e confirmação sorológica do HIV, e sua variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade, justificam a importância do controle da qualidade desses produtos.

O monitoramento efetivo dos conjuntos para diagnóstico de uso “in vitro” para a detecção de anti-HTLV, encontra-se regulamentado por força de legislação sanitária tornando obrigatória a avaliação da sua qualidade antes do mesmo ser disponibilizado no mercado através da Portaria nº 8/96/SVS/MS, revogada pela RDC nº 206/2005. A necessidade de efetivar sistemas que garantam a qualidade de produtos e serviços ligados à saúde vem sendo uma preocupação constante do setor terapêutico. Garantir a qualidade de insumos utilizados na qualificação do sangue e seus componentes implica na confiabilidade do diagnóstico e conseqüentemente na segurança do sangue utilizado no país.

Neste contexto, o Laboratório de Sangue e Hemoderivados do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (LSH/INCQS), vem analisando sistematicamente a sensibilidade e especificidade diagnóstica dos conjuntos de diagnóstico de uso *in vitro* através de análise prévia, fiscal e de controle, em atendimento à demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/MS. Para verificar a qualidade dos kits de diagnóstico, são utilizados painéis sorológicos com amostras verdadeiramente positivas e negativas.

A confecção e posterior ampliação do painel realizado neste trabalho teve por objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade dos kits de diagnóstico de uso *in vitro* empregados na triagem e confirmação sorológica do HTLV.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Confeccionar e ampliar um painel sorológico positivo de referência para HTLV tipo I e II.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar amostras verdadeiramente positivas para anti HTLV-I/II;
- Confeccionar um painel sorológico de referência a ser empregado na avaliação de conjuntos diagnósticos utilizados na triagem e no diagnóstico laboratorial do HTLV-I/II;
- Ampliar a capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH/INCQS), no controle da qualidade dos conjuntos de diagnóstico para a detecção de anticorpos para HTLV-I/II, em suas diferentes metodologias.

4 METODOLOGIA

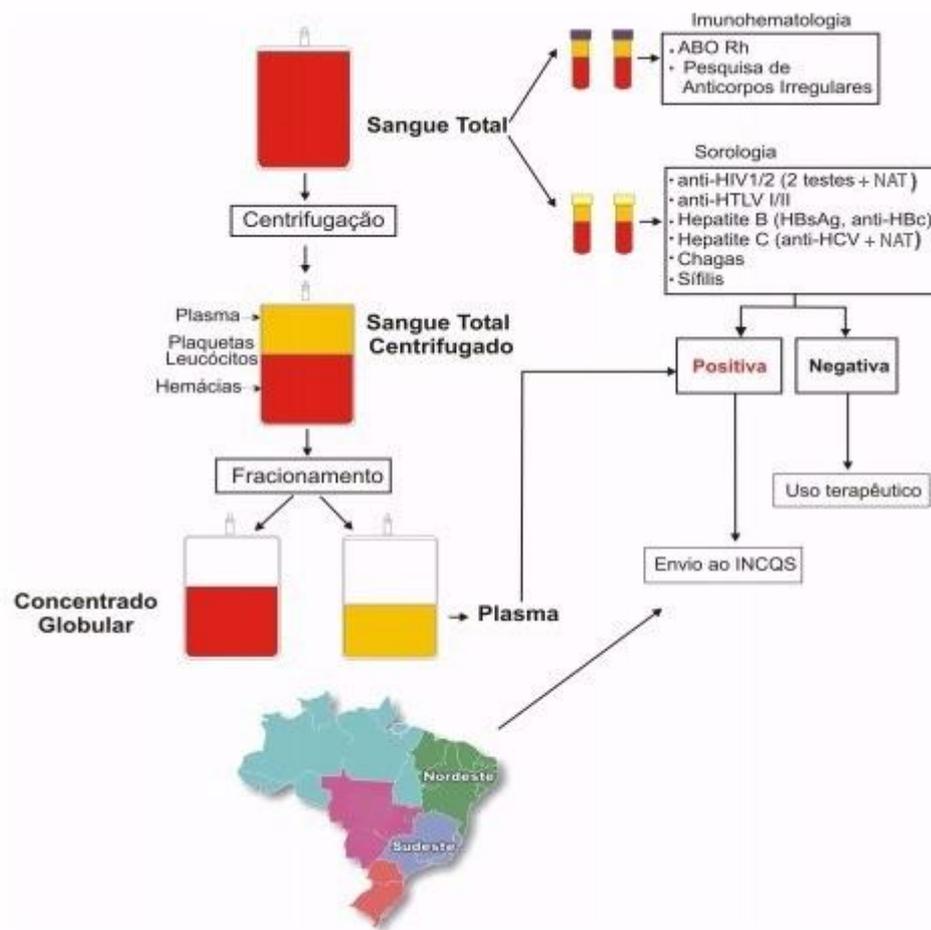
4.1 AMOSTRAS

Para a confecção do painel anti-HTLV foram obtidas bolsas de todo território nacional. No período de 2000 a 2013 através de solicitação formal, Serviços de Hemoterapia foram contatados para encaminhamento de unidades de plasma ao INCQS que após a realização dos testes de triagem sorológica, conforme Resolução RDC nº 34/2014, apresentaram resultado reagente para um ou mais marcadores testados e por isso, consideradas impróprias para o uso terapêutico segundo critérios instituídos na legislação vigente, seriam descartadas.

Para cada doação realizada, devem ser obrigatoriamente realizados exames laboratoriais de triagem de alta sensibilidade para detecção de marcadores para as seguintes doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue, independente dos resultados de doações anteriores, segundo critérios determinados na Resolução citada e nas demais normas do Ministério da Saúde: Doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C, HIV 1/2, HTLV-I/II e Sífilis.

As unidades de plasma que foram encaminhadas ao INCQS possuíam pelo menos um resultado reagente nos testes sorológicos de triagem citados anteriormente e todas as unidades de plasma foram obtidas a partir do fracionamento do sangue total de doadores, colhido com anticoagulante, conforme a FIGURA 6.

Figura 6: Obtenção das unidades de plasma



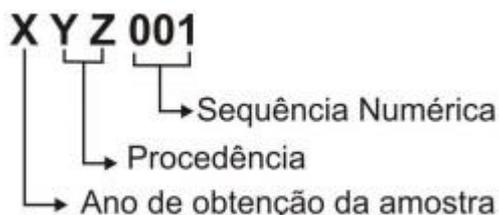
fonte:(LSH)

4.2 RECEBIMENTO, CADASTRO E IDENTIFICAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA

As unidades de plasma foram conduzidas ao Laboratório de Sangue e Hemoderivados (LSH) congeladas, embaladas em caixas de isopor, acompanhadas de documentação pertinente, constando volume aproximado de plasma e resultados da sorologia, quando aplicável. No ato do recebimento, foram cadastradas em caderno ata de acordo com o recomendado no POP número 65.34200.013, conforme FIGURA 7. Na unidade de plasma constam as seguintes informações: ano vigente, inicial do serviço de hemoterapia de

origem, código alfa numérico, seqüencial do laboratório fabricante da bolsa, anticoagulante, data da coleta e resultado sorológico.

Figura 7: Modelo de Cadastro das Unidades de Plasma no Caderno de Cadastro

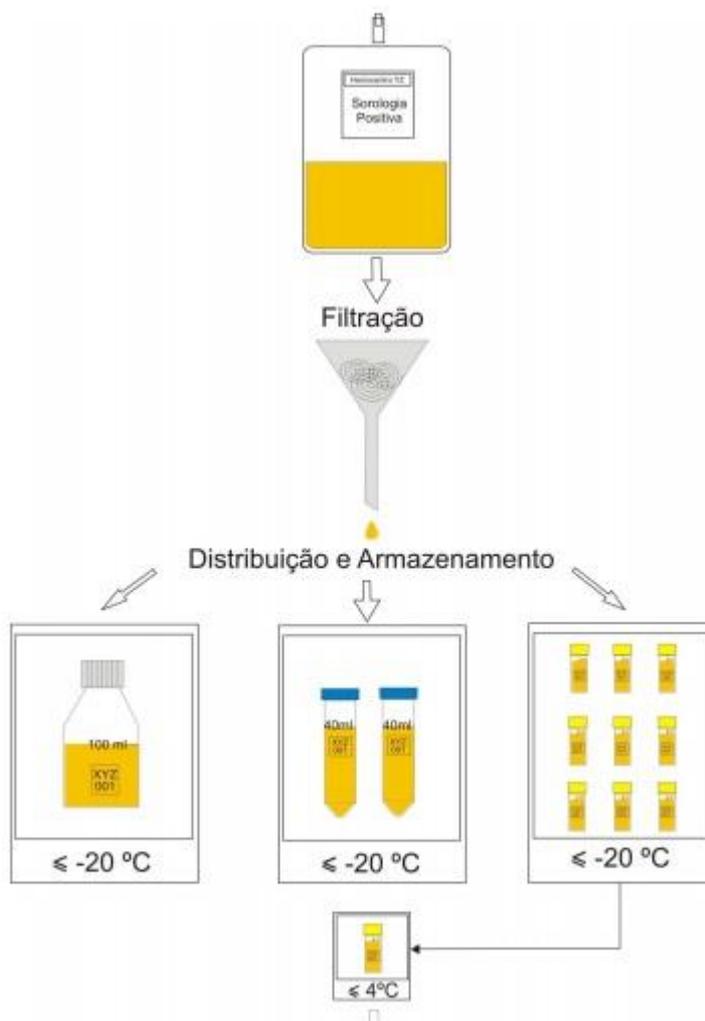


fonte:(LSH)

4.3 PROCESSAMENTO DAS UNIDADES DE PLASMA

As unidades foram descongeladas a temperatura ambiente e seu conteúdo filtrado, individualmente, em gaze hidrófila (09 fios/cm², 05 dobras – 08 camadas) para minimizar a formação de fibrina. As unidades de plasma fracionadas não receberam nenhum tipo de solução conservante. Em seguida a filtração, as unidades foram distribuídas e estocadas em aproximadamente 100 mL de plasma em garrafas Nalgene™ com capacidade para 250 mL, estocadas a temperatura igual ou inferior a -20°C; em torno de 40 mL em dois tubos Falcon™ com capacidade para 50 mL cada, estocados a temperatura igual ou inferior a -20°C; cerca de 20 mL distribuídos em 10 criotubos com volume aproximado de 2 mL cada. Um total de 9 criotubos foram estocados a temperatura igual ou inferior a -20°C e 1 criotubo estocado a 4°C (± 2°C) para realização da rotina de testes sorológicos (FIGURA 8).

Figura 8: Esquema de Processamento das Unidades de Plasma



fonte: (LSH)

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES DE PLASMA

A caracterização das unidades de plasma foi obtida seguindo criteriosamente a legislação vigente aplicável à triagem sorológica de doadores em Serviços de Hemoterapia. Após o recebimento, codificação e armazenamento das unidades de plasma pelo laboratório LSH, a etapa seguinte refere-se à caracterização e confirmação sorológica das unidades de plasma fracionadas. As unidades de plasma foram testadas frente a diferentes marcadores: Doença de Chagas, Hepatite B, Hepatite C, HIV 1/2, HTLV-I/II e Sífilis e foram realizados em cumprimento à legislação vigente:

- ✓ Sífilis: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-treponêmico ou não-treponêmico;
- ✓ Doença de Chagas: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-T Cruzi;
- ✓ Hepatite B (HBV): 1 (um) teste para detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) e 1 (um) teste para detecção de anticorpo contra o capsídeo do vírus da hepatite B (anti-HBc), com pesquisa de IgG ou IgG + IgM;
- ✓ Hepatite C (HCV): 2 (dois) testes em paralelo: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HCV ou para detecção combinada de antígeno/anticorpo; e 1(um) teste para detecção de ácido nucléico do vírus HCV por técnica de biologia molecular;
- ✓ HIV 1 e 2: 2 (dois) testes em paralelo: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HIV (que inclua a detecção do grupo O) ou 1(um) teste para detecção combinada de antígeno/anticorpo (que inclua a detecção do grupo O); e 1(um) teste para detecção de ácido nucléico do vírus HIV por técnica de biologia molecular;
- ✓ HTLV I/II: 1 (um) teste para detecção de anticorpo anti-HTLV-I/II.

A Resolução nº 34/2014 está vigente desde julho de 2014. Tendo em vista que as amostras foram recebidas em data anterior à vigência desta, as amostras anteriores a 2010 foram executadas conforme a Resolução 153/04 e as amostras anteriores a 2014 foram executadas conforme a Resolução 57/10

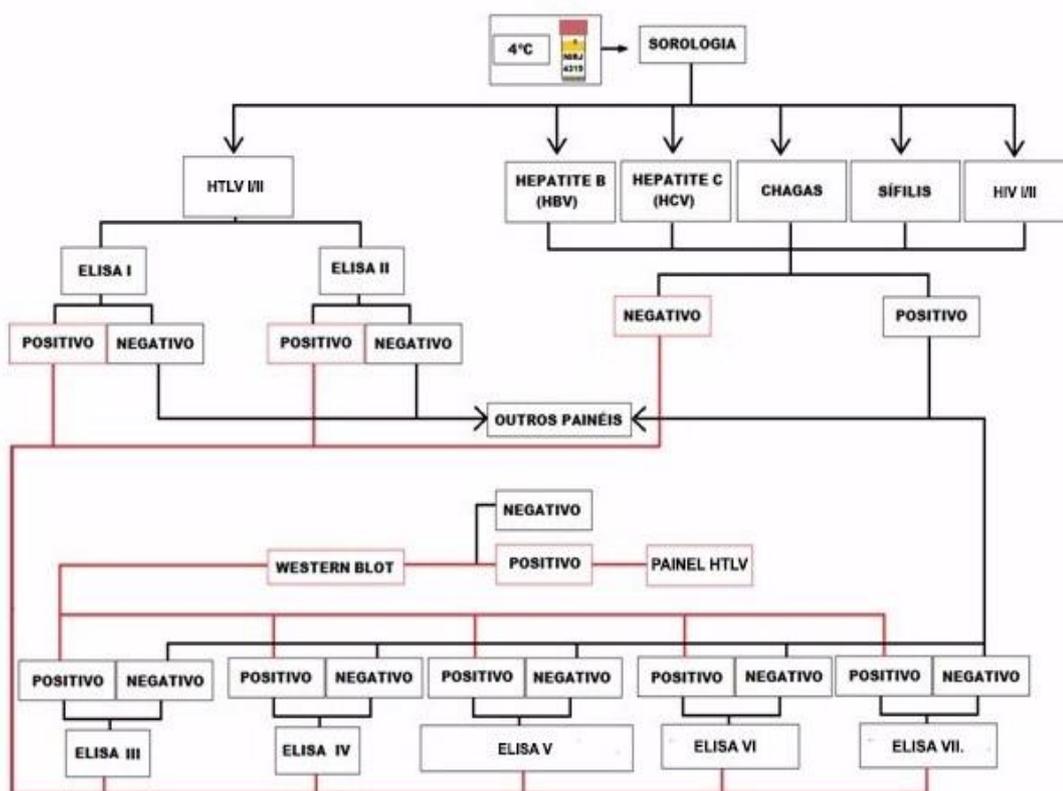
Para ampliação e confecção do novo lote do painel HTLV foram selecionadas amostras inicialmente reagentes para HTLV que foram enviadas pelos hemocentros como reagentes para este marcador.

Após confirmação da sorologia nos testes ELISA I e II as amostras foram avaliadas por mais outros ensaios de ELISA, objetivando melhor caracterização do painel HTLV. Para tal foi realizado:

- ✓ No mínimo 05 (cinco) ELISAs;

A presença de anticorpos direcionados a proteínas diversas do HTLV-I/II foi confirmada por meio da realização da técnica de Western Blot, considerada padrão ouro (FIGURA 9).

Figura 9: Esquema para caracterização de Unidades de Plasma



Os testes feitos seguiram criteriosamente as instruções de uso do fabricante. Todos os conjuntos de diagnósticos usados possuem registros na ANVISA/MS. Em relação a caracterização:

- ELISA- Ensaio Imunoenzimático: no mínimo 05 (cinco) testes:
Detecção de anticorpos – todas as amostras.

Todos os produtos utilizados para caracterização encontram-se listados no QUADRO 1 independentemente do número de amostras que contemplaram as análises. Devido à grande homogeneidade de recebimento e grande número de amostras, não foi possível caracterizá-las com as mesmas marcas de

produtos, embora foram caracterizadas com sensibilização da fase sólida semelhante.

QUADRO 1: Conjuntos diagnósticos utilizados na confirmação e caracterização sorológica das amostras obtidas de unidades e plasma

METODOLOGIA	TESTES	SENSIBILIZAÇÃO DA FASE SÓLIDA
ELISA – Detecção de Anticorpos	ELISA-I	Ag HTLV-I/II Inativado
	ELISA-II	Ags do HTLV-I/II
	ELISA-III	Ags recombinantes de HTLV-I/II
	ELISA-IV	Ags HTLVs inativos e 01 Ag recombinante;
	ELISA-V	Combinação de 04 Ags recombinantes dos tipos I/II do HTLV
	ELISA-VI	Ag sintético
	ELISA-VII	Ag HTLV-I/II Inativado

4.5 TESTES SOROLÓGICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL

4.5.1 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

Conforme a metodologia seguida no LSH, a interpretação dos testes ELISA empregados na caracterização das unidades de plasma para os diversos marcadores sorológicos foi feita seguindo e respeitando, rigorosamente, os critérios estabelecidos pelos fabricantes para validação do ensaio e cálculo do ponto de corte (*Cut-Off*).

Para homogeneização de resultados obtidos nos diversos ensaios imunoenzimáticos, a reatividade foi determinada pela razão dos valores de densidade ótica (D.O.) entre os plasmas avaliados e o “Cut-off” e seu resultado chamado de Racio.

$$\frac{D.O. \text{ do plasma teste}}{\text{"Cut-Off" (ponto de corte)}} = \text{Racio}$$

As unidades de plasma que apresentaram valores de *racio* superiores ou iguais a 1,0 foram consideradas reativas, enquanto os valores inferiores a 1,0 foram consideradas não-reativas.

4.5.2 Western Blot

Os ensaios de WB foram realizados em todas amostras reativas. Para interpretação, utilizamos os critérios estabelecidos pelo fabricante do conjunto de kit de diagnóstico, QUADRO 2 e 3.

Quadro 2: Proteínas do HTLV e critério de interpretação do teste de *Western Blot*

Proteínas virais	Genes	Características
gp46	<i>Env</i>	proteína de superfície do envelope viral
rgp46	<i>Env</i>	proteína recombinante derivada da gp 46
gp21	<i>Env</i>	proteína transmembrana do envelope viral
gd21	<i>pol</i>	Proteína recombinante contendo o epítipo imunodominante da gp 21
p24	<i>Gag</i>	proteína do capsídeo viral
p19	<i>Gag</i>	proteína da matriz viral

Quadro 3: Critérios de interpretação do *Western Blot* anti-HTLV

Resultado	Bandas encontradas
Positivo para HTLV-I	p19 e/ou p24 + gd 21 + rgp 46-I
Positivo para HTLV-II	P19 e/ou p24 + gd21 + rgp 46-II
Positivo para HTLV-I e HTLV-II*	P19 e/ou p24 + gd 21 + rgp 46-I + rgp 46-II
Positivo para HTLV (não tipado)	P19 e/ou p24 + gd 21 ou gp46 (nativa ou recombinante)
Indeterminado	Qualquer combinação de bandas que não descritas acima
Negativo	Nenhuma reatividade

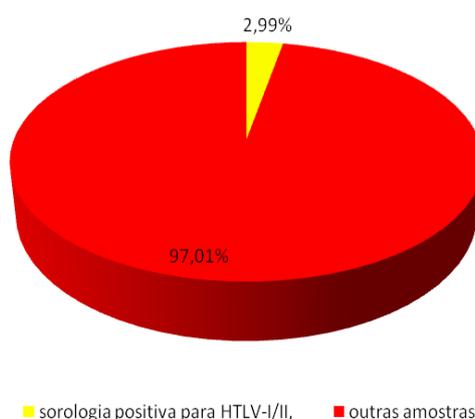
Nota: Proteínas de gag: p19 e p 24. Proteínas transmembrana: gd 21. Proteínas de env: rgp 46-I, rgp 46-II. * não sendo possível a realização de provas de biologia molecular a dupla infecção pode ser diagnosticada quando o padrão de bandas apresentado persistir, mesmo após diluição do soro 1/10, 1/100 e 1/1000. Fonte: (Brasil, 2004)

5 RESULTADOS

5.1 DA QUANTIDADE DE UNIDADES DE PLASMA RECEBIDAS

Foram encaminhadas e recebidas para análise no Laboratório de Sangue e Hemoderivados no período de 2000 a 2013 um quantitativo de 3.559 unidades de plasma, que foram denominadas amostras por apresentar sorologia reagente para diversos marcadores e obtidas de diversas regiões do país. Destas amostras, 2,99% (109/3.559) foram recebidas como sorologia positiva para HTLV-I/II, conforme o GRÁFICO 1.

Gráfico 1: Quantitativo total de amostras recebidas

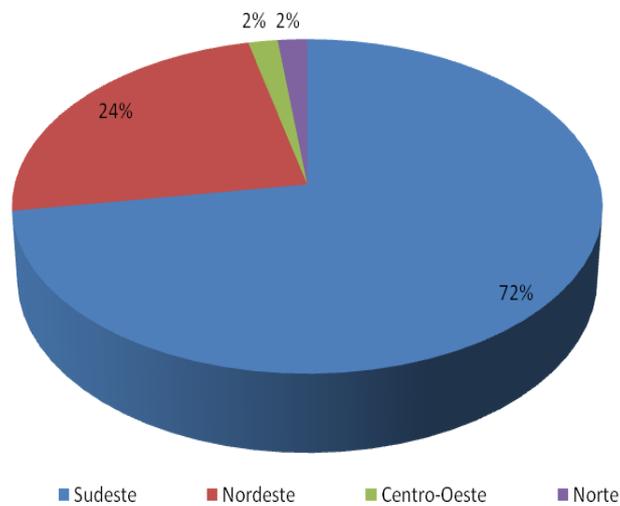


fonte: (LSH, 2000-2013)

5.2 DA ORIGEM DAS UNIDADES DE PLASMA

Das 109 unidades de plasma recebidas, doravante denominadas de amostras, 72% (79/109) foram provenientes da região Sudeste, 24% (26/109) da região Nordeste, 2% (02/109) da região Centro-Oeste e 2% (02/109) da região Norte, conforme o GRÁFICO 2.

Gráfico 2: Origem das unidades de plasmas recebidas



fonte: (LSH, 2000 a 2013)

5.3 DA SELEÇÃO DAS AMOSTRAS POR VOLUME

Das 109 amostras analisadas, 15,52% (18/109) foram descartadas por possuírem menos de 200 mL. Sendo assim, 78,45% (91/109) amostras seguiram para análise sorológica, conforme o GRÁFICO 3.

Gráfico 3: Seleção das Amostras



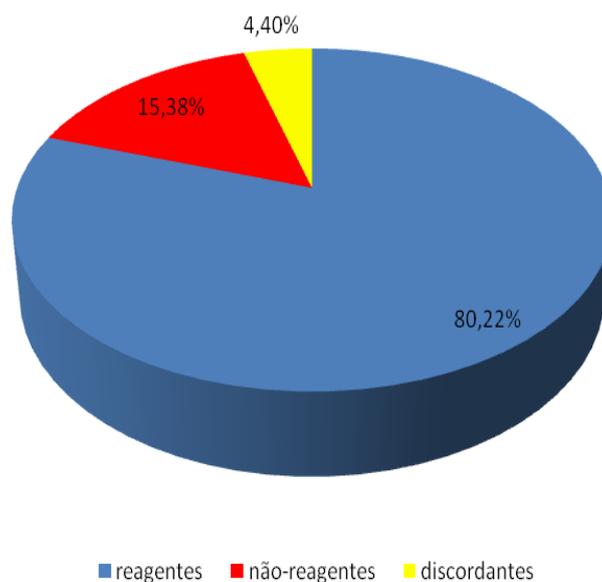
fonte: (LSH, 2000-2013)

5.4 DOS RESULTADOS SOROLÓGICOS OBTIDOS

As 91 amostras selecionadas foram analisadas inicialmente com 02 (dois) ELISAs para detecção de anticorpos (ELISA I e II) com diferentes composições antigênicas, conforme demonstrado no QUADRO 1.

Assim, 80,22% (73/91) das amostras obtiveram resultados REAGENTES em 02 (dois) testes executados, 15,38% (14/91) obtiveram resultado NÃO REAGENTE em ambos os testes e 4,40% (04/91) amostras obtiveram resultados DISCORDANTES, ou seja, reagente em um teste e não-reagente para o outro, conforme o GRÁFICO 4.

Gráfico 4: Resultados dos ELISAs para detecção de anticorpos



fonte: (LSH, 2000-2013)

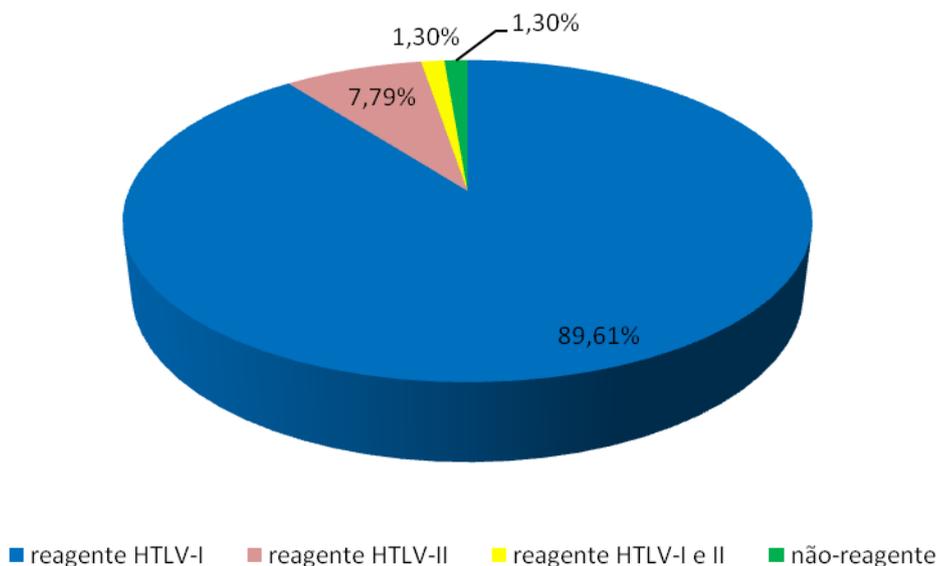
As médias dos valores de *racio* das unidades encontradas nos ensaios (ELISA I, II, III, IV, V, VI e VI) foram 9,01; 16,08; 2,64; 6,85; 4,55; 13,46 e 11,54 respectivamente. O perfil apresentado demonstrou que as unidades analisadas são de baixa, média e alta reatividade.

Assim, seguiram para melhor caracterização, confirmação e seleção para composição do painel, 77 amostras que foram submetidas ao ensaio confirmatório pela técnica de *Western Blot*.

5.5 *Western Blot*

Foram selecionadas 77 amostras, todas com pelo menos um resultado reagente para os testes aplicados. Depois de submetidas à análise, constatou-se que embora todas tivessem pelo menos um resultado positivo, 98,70% (76) confirmaram ser verdadeiramente reagentes com a presença das bandas *env*, *gag*, *pol*. Destas, 89,61% (69) obtiveram resultado reagente para HTLV-I; 7,79% (seis) amostras foram reagentes para HTLV-II e 1,30% (uma) para ambos os marcadores. Ainda houve 1,30% (uma) amostra que foi considerada não-reagente, de acordo com o resultado preconizado pelo fabricante, conforme GRÁFICO 5.

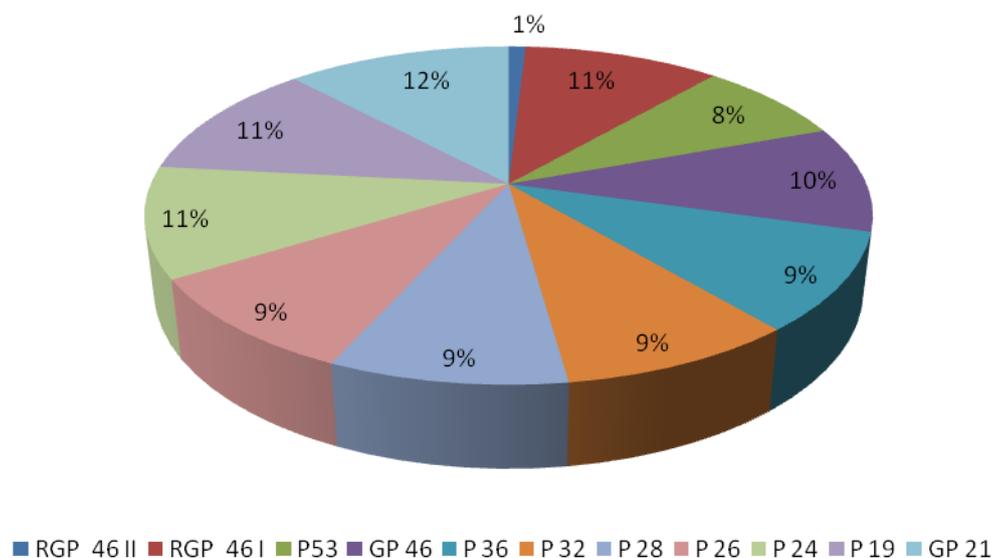
Gráfico 5: Resultados Obtidos na Técnica de *Western Blot*



fonte: (LSH, 2000-2013)

A distribuição da frequência de aparecimento das bandas nas diferentes unidades de plasma analisadas deu-se de forma homogênea. As 76 amostras apresentaram as bandas específicas no *Western Blot* para anti-HTLV, conforme GRÁFICO 6.

Gráfico 6: Distribuição da frequência de aparecimento das bandas na Técnica de *Western Blot*

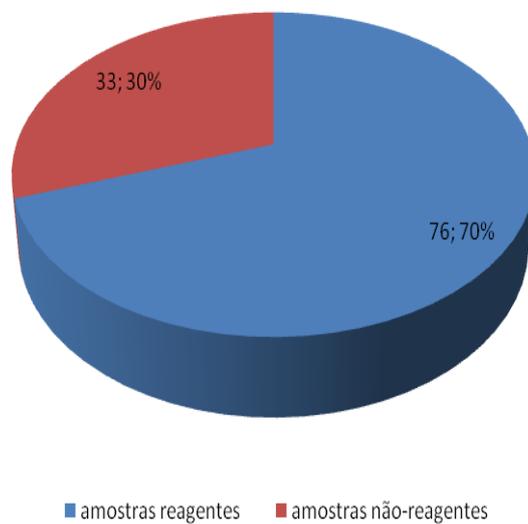


fonte: (LSH 2000-2013)

5.6 QUANTITATIVO DE AMOSTRAS VERDADEIRO-POSITIVAS PARA HTLV

Após a análise dos resultados foi possível caracterizar 76,70% (76/109) amostras com verdadeiro positivas, conforme GRÁFICO 7. Estas irão compor o novo lote de amostras reativas para HTLV e possibilitarão a ampliação da capacidade analítica do Laboratório de Sangue e Hemoderivados no controle da qualidade de conjuntos para diagnóstico sorológico do HTLV, conforme GRÁFICO 7.

Gráfico 7: Total de amostras reagentes e não-reagentes.



fonte: (LSH, 2000-2013)

6 DISCUSSÃO

Com a finalidade de elaborar um painel positivo para HTLV utilizado na avaliação de kits de diagnósticos, unidades de plasma reagentes para marcadores distintos foram encaminhadas através de solicitações para Serviços de Hemoterapia de diversas regiões do país no período de 2000 a 2013. Foram recebidas um total 3.559 e 109 apresentaram reatividade para o HTLV e assim prosseguiram os testes sorológicos.

A pesquisa de anticorpos dirigidos ao HTLV em amostras de doadores de sangue tornou-se obrigatória em 1993 por meio da portaria 1376/93-SVS/MS. Essa portaria aprova alterações na Portaria 721/GM de 1989, que delibera normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e hemoderivados, obrigando a determinação ABO, Rh(D), antígeno D fraco (Du) e dos testes para identificação das hepatites B e C, doença de Chagas, sífilis, HIV, dos anticorpos anti-HTLV I/II e anti-HBc. (Carrazzone *et al*, 2004). Atualmente a RDC em vigor é a nº 34 de 11 de junho de 2014, que confirma a exigência para liberação do sangue e seus hemoderivados.

Encontrar um resultado falso negativo em um Serviço de Hemoterapia ou em um laboratório clínico significa um grande risco sanitário, assim como um resultado falso positivo também implica desordens sociais e pessoais. A introdução do POP como um instrumento utilizado pelas Boas Práticas de Fabricação contribui para a redução de erros contribuindo para que a rotina básica seja seguida e que diferentes atividades possam ser executadas no serviço de hemoterapia. Esta medida é inserida por meio da Portaria 121/95 e continua em vigor até os dias atuais, tornando-se componente das Boas Práticas de Hemoterapia (BRASIL, 2007).

Grande parte das unidades de plasma foi oriunda da região Sudeste, seguido pela região Nordeste, fato que pode estar associado com os dados epidemiológicos encontrados nestas regiões. Das 109 amostras selecionadas,

18 foram descartadas por possuírem volume insuficiente. As amostras citadas não foram utilizadas em nenhum dos testes sorológicos.

Das 109 unidades de plasma que foram rotuladas e descartadas pelos serviços de hemoterapia de origem por apresentar reatividade para HTLV e que possuíam volume adequado para os testes sorológicos, 91 amostras foram analisadas pelo teste de triagem ELISA. Estes testes foram realizados para detectar anticorpos dirigidos ao HTLV-I/II. Na fase sólida foram utilizados antígenos recombinantes do HTLV-I/II, antígenos inativos do HTLV-I/II, combinação de antígenos recombinantes do HTLV-II e ainda antígenos sintéticos. Embora existam outros ensaios sorológicos que possam ser utilizados na detecção do HTLV, no período contemplado para confecção do painel, os testes de triagem que foram encaminhados para análise prévia e posterior análise das amostras foram os citados no decorrer deste trabalho.

Os valores de *racio* das unidades de plasma apresentaram variaram de 2,64 a 16,08, o que representa que as amostras possuem baixa, média e alta reatividade. Embora a metodologia utilizada para caracterizar as amostras fosse igual, a sensibilização de cada teste foi distinta.

Todas as amostras reativas ao menos para um teste (77 amostras) foram submetidas ao teste de *Western Blot* para confirmar os resultados do teste de triagem. Destas 76 confirmaram ser verdadeiramente positivas com a presença das bandas ENV, GAG e POL e apenas uma amostra foi detectada como não-reagente, por não possuir bandas.

As unidades de plasma selecionadas com verdadeiramente positivas e que compõem o novo painel anti-HTLV apresentaram resultados dentro dos padrões internacionais para o *Western Blot*, cujo critério de positividade requerido inclui a reatividade para p19 e/ou p24, (gp46, rgp46I ou rgpII) e para gd21. Sobre os subtipos do HTLV podemos analisar que 69 apresentaram anticorpos apenas anti-HTLV-I; 06 amostras apenas anti-HTLV-II e 01 para os dois subtipos.

Uma amostra foi caracterizada como não-reagente, pois não possuía nenhuma banda. A amostra foi descartada para compor o painel mesmo que

tenha possibilidade de ser uma amostra em fase de soroconversão. Indivíduos podem desenvolver anticorpos anti-HTLV em concentrações baixas e a soroconversão pode ocorrer durante anos após a infecção e com isso, torna-se difícil a detecção destes anticorpos pelos testes sorológicos (SANTOS; LIMA, 2005).

A inclusão de unidades de plasma no painel sorológico é realizada de forma randômica (aleatória) e dinâmica, pois matéria-prima (plasma humano) é esgotável. Uma vez que não é indicado na literatura um número máximo de unidades de plasma para confecção de um painel sorológico, as unidades de plasma são recebidas, caracterizadas e adicionadas ao painel na medida em que vão atendendo as especificações para sua composição e assim contribuem para a melhora permanente da capacidade de análise do LSH.

7 CONCLUSÃO

No período de 2000 a 2013, um total de 3.559 unidades de plasma de diversas regiões brasileiras foram descartadas para uso terapêutico e encaminhadas para o INCQS. Foram caracterizadas 76 amostras através de testes sorológicos de triagem e confirmatório para compor e ampliar o painel positivo anti-HTLV. Este painel sorológico é utilizado como a mais importante ferramenta no controle da qualidade dos kits de diagnóstico para anti HTLV-I/II comercializados no mercado brasileiro.

Estes conjuntos de diagnósticos são utilizados em Serviços de Hemoterapia na triagem sorológica dos doadores de sangue a fim de garantir a qualidade e segurança na transfusão assim como em laboratórios clínicos como apoio ao diagnóstico da infecção pelo HTLV e por isso a análise da especificidade e sensibilidade destes kits de diagnóstico são de extrema importância para a saúde pública.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARMPAS, D. B. S.; et al. Infecção pelo HTLV-1/2 em gestantes brasileiras. **HUPE**, v. 13, n. 3, p. 80-87, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 jun. 2014. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f613c5804492c25a9989db281231adba/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+34-2014.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 15 dez 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas**. Brasília: Anvisa, 2007, 124 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. Brasília: Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, 1998, 58 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 9: Infecções virais**. Brasília: Anvisa, 2013, 124 p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004, 111 p.

CABRAL, F. A. B. **Avaliação da carga viral plasmática do HTLV-1 em indivíduos assintomáticos e desenvolvendo a mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

CARRAZZONE, C.F.V.; et al; Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Rev.Bras.Hematol.Hemoter.**; v.26, n 2, p 93-98, 2004.

CATALAN-SOARES B. C.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000) Aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 4, n. 2, 2001.

CHAMPS, A. P. S. **Mielopatia associada ao HTLV-1: perfil clínico, epidemiológico e fatores prognósticos de incapacidade para Marcha**.

Dissertação de Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.
Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

CHISSUMBA, R. M.; et al. CD4+CD25High Treg cells in HIV/HTLVCo-infected patients with neuropathy: highexpression of Alpha4 integrin and lowerexpression of Foxp3 transcription factor. **BMC Immunology**, v. 16, n. 52, 2015.

EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL.
Geographical distribution of areas with high prevalence of HTLV-1 infection. Stockholm: ECDC, 2015.

FERREIRA, A.W; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes.** 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, p 432

FIGUEIRÓ-FILHO E. A.; et al. Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 12, p. 719-25, 2005.

GALVÃO-CASTRO, BERNARDO; et al. Epidemiologia e origem do HTLV-I em Salvador estado da Bahia: A cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia.** v. 79. n. 1, p. 3-10, 2009.

GLÓRIA, L. M.; et al. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes infectados pelo HTLV-1 em Belém/Pará. **Cad. Saúde Colet**, v. 23, n. 2, p. 57-162, 2015.

GRASSI, M. F. R.; et al. Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Proviral Load of HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Patients According to New Diagnostic Criteria of HAM/TSP. **Journal of Medical Virology**, v. 83, p. 1269-1274, 2011.

HEMORIO. **Infecção pelo HTLV: Orientações básicas aos pacientes e familiares.** Rio de Janeiro, 2014.

IDEXX, C.H.L.I. **Elisa Technical Guide.** USA, 2013. Disponível em:
<https://www.idexx.com/pdf/en_us/livestock-poultry/elisa-technical-guide.pdf>.
Acesso em 05 jan. 2016.

JABBOUR, M.; et al. Hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: a review. **Bone Marrow Transplantation**, v. 46, p. 1039-1044, 2011.

LOPES, B. P. T. **Avaliação dos fatores de risco associados à transmissão do HTLV-1 e do HTLV- 2, em doadores de sangue, na cidade de Belém do Pará.** Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. Universidade Federal do Pará. Belém, 2006.

LOPES, M. S. S. N.; PROIETTI, A. B. F. C. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de *look-back*. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 3, p. 229-240, 2008.

LOUREIRO, P. Infecção pelo HTLV-1: Diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste. Tese de Doutorado em Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008.

MACHADO, A. S.; et al. Imunopatogênese da infecção pelo HTLV-1: influência sobre a resposta imune tipo 2. **Rev. Bras. alerg. Immunopatol.**, v. 26, n. 4, 2003.

MARTINS, F. M.; et al. Conhecendo o HTLV e suas implicações no atendimento odontológico. **Rev. Gaúcha Odontol.**, v. 59, n. 2, p. 293-297, 2011.

MENDONÇA, V. F. **Confecção de painel sorológico positivo ANTI-HTLV.** Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Rio de Janeiro, 2012.

MONTANHEIRO, P. A. **Quantificação de carga proviral do vírus linfotrópico de células T humanas tipo (HTLV-1) e marcadores imunológicos em indivíduos portadores e pacientes com TSP/HAM.** Tese de Doutorado em Microbiologia. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

MORAES, C. S. et al. Métodos experimentais no estudo de proteínas. **Fiocruz**, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/apostila_volume_1.pdf>. Acesso em 05 jan. 2016.

MORATO, C. B. A. **Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).** Monografia de Pós-Graduação *lato sensu* em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial. Universidade Paulista e Centro de Consultoria Educacional. Recife, 2012.

MOXOTO, I.; et al. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 1, p. 37-41, 2007.

OLIVEIRA, A. S.; et al. Epidemiologia e fatores de risco da infecção do vírus HTLV em gestantes. **Rev. Saúde. Com.**, v. 10, n. 2, p. 184-195, 2014.

PAIS-CORREIA, A. M.; et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, 2010.

PINTO, M. T. **Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4* na infecção pelo HTLV-1**. Dissertação de Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

RIBEIRO, A. S. **Confecção de painel sorológico para controle da Qualidade de conjuntos de diagnósticos para detecção do ANTI-HIV**. Monografia de Pós-Graduação *Lato Sensu* em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2006.

ROCHA, P. N.; et al. The cause of urinary symptoms among Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) infected patients: a cross sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, n. 15, 2007.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. O vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): quando suspeitar da infecção? **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 56, n. 3, p. 340-7, 2010.

ROMANOS, M.T.V. et al, *Víroses Oncogênicas*. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p 534-541.

SANTOS, F. L. N.; LIMA, F. W. M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 2, p. 105-16, 2005.

SEGURADO, A.A.C. Infecções Causadas pelos Vírus Linfotróficos de Células T Humanas – HTLV. In: FERREIRA, A.W; ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 3 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, p 431-435.

SODRÉ, H. R. S.; et al. Soroepidemiologia da infecção por HTLV-I/II em população assistida pelo Programa Saúde da Família em Salvador, Bahia. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 5, p. 369-374, 2010.

TAMEGÃO-LOPES, B. P.; et al. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 6, p. 548-552, 2006.

VERONESI, RICARDO; FOCACCIA ROBERTO. **Tratado de Infectologia**. 4 Ed. São Paulo: Atheneu, 2009, p 14-26; 589-594.