



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES



Mestrado em Saúde Pública

Bruna Cavalcanti Arruda

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO
REAL NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO
HTLV-I**

RECIFE
2007

AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HTLV-I

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Yara de Miranda Gomes, BSc, MSc, PhD.

Co-orientador: Wayner Vieira de Souza, MSc, PhD.

Recife
Abril-2007

Bruna Cavalcanti Arruda

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO PELO HTLV-I**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 27/04/2007

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Yara de Miranda Gomes
CPqAM/FIOCRUZ

Prof. Dr. Divaldo de Almeida Sampaio
Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco/HEMOPE

Profa. Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
CPqAM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, Patrícia e Pedro, e ao meu
irmão Gustavo que sempre me incentivaram,
apoiaram e acreditaram em mim.*

Um grande beijo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Yara Gomes, pela sua orientação e confiança na minha capacidade de trabalho.

Ao Dr. Wayner Souza, pela co-orientação sempre pronta.

Ao Dr. Rômulo Maciel Filho, Diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, onde parte do trabalho foi realizada.

À Dra. Paula Loureiro, pela fundamental orientação desde a minha iniciação científica, confiança, apoio e principalmente pela amizade.

À coordenação da pós-graduação e à secretaria acadêmica, pelo apoio constante.

Aos meus companheiros da Fundação HEMOPE, em especial Bruno Correa e Ana Clara Gurgel pela ajuda, apoio e amizade.

A todos que compõem o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, por contribuírem para a formação de recursos humanos, especialmente no nordeste do país.

Aos bibliotecários do CPqAM/Fiocruz, pelos artigos científicos fornecidos.

Ao Prof^o Paulo Roberto Souza, Lucas e Rafael, do Laboratório de Virologia do LIKA, pela ajuda nos trabalhos de bancada.

À Dra. Viviana Olavarria e Dr. Luiz Alcântara por terem gentilmente cedido o plasmídeo utilizado no presente trabalho.

Aos pacientes portadores de HTLV e indivíduos saudáveis que aceitaram participar deste estudo e contribuir para a pesquisa científica.

As minhas amigas, Suelene, Shirley, Renata e Amélia pelo incentivo e companherismo constantes.

Aos Órgãos de Fomento à Pesquisa, FACEPE e CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo I (HTLV-I) e do tipo II (HTLV-II) são retrovírus humanos que causam destruição e/ou transformação nos linfócitos T. A transmissão ocorre através de relações sexuais, transfusões sanguíneas e produtos hemoderivados, agulhas e seringas contaminadas, da mãe infectada para seu filho, especialmente através do aleitamento materno. No Brasil, cerca de 750.000 pessoas sobrevivem com o vírus. O diagnóstico da infecção pelo HTLV-I/II é feito, habitualmente, com testes sorológicos, baseados na pesquisa de anticorpos contra antígenos do vírus presentes no soro do indivíduo infectado. Como os genomas provirais do HTLV-I e HTLV-II exibem grande homologia, há uma expressiva sororeatividade cruzada. Assim, em muitos casos, a detecção de anticorpos anti-HTLV-I/II embora caracterize a infecção viral, não permite que se estabeleça a distinção entre ambos os agentes. Os testes moleculares empregados para o diagnóstico dos vírus HTLV-I/II, baseiam-se na pesquisa de seqüências genômicas provirais permitindo, com isso, o diagnóstico da infecção pelo antes do aparecimento de qualquer sinal ou sintoma. A carga proviral de HTLV em indivíduos infectados pode ser determinada através da utilização da PCR em tempo real, uma técnica mais rápida e com menor risco de contaminação que a PCR simples ou *nested* PCR. Para isso, 63 amostras, sendo 33 amostras de indivíduos com sorologia reagente para HTLV e 30 amostras de doadores de sangue da Fundação HEMOPE foram analisadas para identificação do tipo viral (I ou II) e determinação da carga proviral. A sensibilidade da PCR qualitativa, para identificação do tipo viral, em relação à sorologia foi de 87,5% (IC 95%: 70,1 – 95,9%) e a especificidade foi de 100% (IC 95%: 85,9 – 100,0%). Já a sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real foram de 100% (IC 95%: 86,7 – 100,0%) e 96,67% (IC 95%: 80,9 – 99,8%), respectivamente. A carga proviral dos indivíduos reagentes na sorologia variou entre 13 cópias/ 10^6 células PBMC e 343820 cópias/ 10^6 células PBMC. Nosso estudo também observou que os indivíduos com PET/MAH tiveram carga proviral mais elevada que a dos indivíduos assintomáticos. A utilização da PCR em tempo real na rotina de monitoramento clínico dos indivíduos infectados permitirá um papel relevante na identificação do vírus e na determinação simultânea da carga proviral, contribuindo para direcionar um tratamento adequado.

Palavras-chave: HTLV-I, PCR em tempo real, carga proviral.

ABSTRACT

The human lymphotropic T cell virus type I (HTLV-I) or type II (HTLV-II) are human retrovirus that cause the destruction or transformation of the T lymphocytes. Its transmission occurs through sexual intercourse, blood and hemocomponents transfusions, contaminated needles and syringes, from mother to child, especially through breast feeding. In Brazil, 750000 people live with the infection. The diagnosis of the HTLV-I-II infection is usually done by serologic tests based on the detection of antibodies against viral antigens in the infected serum. Since the proviral genomes of the HTLV-I and HTLV-II have great homology, there is an expressive cross reactivity. Therefore, in many cases, although the detection of HTLV antibodies characterizes the viral infection, it does not allow the establishment of the viral type. Molecular tests used to diagnose the HTLV-I/II viruses are based on the search of the proviral genomic sequences, and allow the diagnoses of the infection before the appearance of any sign or symptom. The HTLV proviral load in infected individuals can be determined through real time PCR, a faster and less contaminating method than the simple PCR or the nested PCR. We analyzed 63 samples, from the Fundação HEMOPE, which 33 were samples from HTLV seropositive individuals and 30 samples from blood donors, to determine the viral type and the proviral load. The qualitative PCR sensitivity in comparison to the serologic test (ELISA) was 87,5% (IC 95%: 70,1 – 95,9%) and the specificity 100% (IC 95%: 85,9 – 100,0%). The real time PCR sensitivity and specificity in comparison to the serologic test (ELISA) was 100% (IC 95%: 86,7 – 100,0%) e 96,67% (IC 95%: 80,9 – 99,8%) respectively. The seropositive individuals proviral load ranged from 13 to 343820 copies/10⁶ PBMC cells. Our study also observed that individuals with TSP/HAM had higher proviral load than those asymptomatic ones. The use of real time PCR in the clinical routine tests of the infected individuals will have a relevant role in the identification of the virus type and the determination of the proviral load, allowing an adequate treatment.

Key words: HTLV-I, Real time PCR, proviral load.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação esquemática da estrutura de um retrovírus humano	13
Figura 2-	Representação do genoma completo do HTLV-I.	13
Figura 3-	Prevalência sorológica para HTLV-I/II (/1000 doações) em doadores de sangue nas capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal	16
Figura 4-	Representação esquemática da amplificação do DNA utilizando TaqMan®	20
Figura 5-	Representação esquemática da amplificação do DNA utilizando técnica do SYBR® Green	21
Figura 6-	Amostra representativa da PCR qualitativa para HTLV-I	33
Figura 7-	Amostra representativa da PCR qualitativa para HTLV-II	33
Figura 8-	Amplificação da curva padrão de albumina, mostrando a linha <i>threshold</i> , e os padrões de 10^5 a 10^2	34
Figura 9-	Regressão linear da curva padrão de albumina	35
Figura 10-	Curva de dissociação dos padrões de albumina	35
Figura 11-	Amplificação da curva padrão de HTLV-I, mostrando a linha <i>threshold</i> , e os padrões de 10^5 a 10^2	36
Figura 12-	Regressão linear da curva padrão de HTLV-I	37
Figura 13-	Curva de dissociação dos padrões de HTLV-I	37
Figura 14-	Dispersão das cargas provirais dos indivíduos HTLV-I positivos na PCR em tempo real	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença I	30
Tabela 2-	Resultados da PCR Qualitativa para HTLV	32
Tabela 3-	Resultados da PCR em tempo real (quantitativa) para HTLV-I	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS – Síndrome de Imunodeficiência adquirida
- ATLL – Leucemia/Linfoma de células T do adulto
- DNA – Ácido desoxiribonucléico
- DNTP – Desorribonucleotídeo trifosfatado
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetraético
- ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- HCL – Ácido clorídrico
- HEMOPE – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
- HTLV I – Vírus linfotrópico de células humanas I
- HTLV II – Vírus linfotrópico de células humanas II
- IFI – Imunofluorescência indireta
- KCL – Cloreto de potássio.
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública/FIOCRUZ
- LTR – *Long Terminal Repeats*
- PBMC – Células mononucleares de sangue periférico
- PBS – Salina tamponada com fosfato
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
- RIPA – Reação de Imunoprecipitação
- RNA – Ácido ribonucléico
- TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
- PET/MAH – Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Características dos vírus linfotrópicos de células T humanas	12
1.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos dos virus HTLV/I e II	14
1.3 Diagnóstico laboratorial	16
1.3.1 Diagnóstico sorológico	17
1.3.2. Diagnóstico molecular	18
2 PERGUNTA CONDUTORA	22
3 JUSTIFICATIVA	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Geral	24
4.2 Específicos	24
5 METODOLOGIA	25
5.1 População de estudo	25
5.2 Considerações éticas	25
5.3 Coleta de sangue	26
5.4 Obtenção e contagem de células PBMC	26
5.5 Extração do DNA a partir de células PBMC	26
5.6 <i>Nested</i> PCR qualitativa	27
5.7 PCR em tempo real	29
5.7.1 Curva padrão	29
5.7.2 Quantificação do HTLV-I nas amostras	29
5.7.3 Quantificação do gene da albumina nas amostras	29
5.8 Análise dos dados	30
6 RESULTADOS	32
6.1 PCR qualitativa para HTLV I e II	32
6.2 Gena da albumina	34
6.3 HTLV-I	36
6.4 Carga proviral de HTLV-I	38
7 DISCUSSÃO	40

8 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	50
Apêndice 1 – Questionário	51
Apêndice 2 – Artigo a ser enviado para publicação	52
ANEXOS	69
Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido	70
Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM	71
Anexo C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características dos vírus linfotrópicos de células T humanas

Os vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo I (HTLV-I) e do tipo II (HTLV-II) são retrovírus humanos geneticamente relacionados, pertencentes à subfamília *Oncovirinae*. São constituídos de partículas esféricas, compostas de *core* central elétron e envelope externo glicoprotéico. A porção central do vírion contém duas cópias de RNA (ácido ribonucléico) de fita única de cadeias positivas (contendo 9 quilobases), as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase, as proteínas da matriz viral e o capsídeo protéico (Figura 1) (SEGURADO, 2001; VERONESI, 2000). O genoma proviral é constituído dos seguintes genes (Figura 2):

- *env*: codifica as proteínas externas do envelope (a precursora gp61/68 e sua derivada gp46) e a proteína transmembrana (gp21);
- *pol*: codifica às enzimas transcriptase reversa (p99), Rnase, endonuclease e protease;
- *gag*: codifica as proteínas do core viral (a precursora p52 e suas derivadas p15, p19 e p24);
- *tax*: codifica a proteína p40^{tax} transativadora do segmento LTR (*Long Terminal Repeat*) e de genes da célula eucariótica infectada;
- *rex*: codifica a proteína p27^{rex}, reguladora pós-transcricional da síntese de proteínas estruturais do vírus;
- segmento LTR: presente nas extremidades do genoma proviral, contém as regiões reguladoras da transcrição viral;
- genes de função ainda pouco conhecida, *rof* e *tof*.

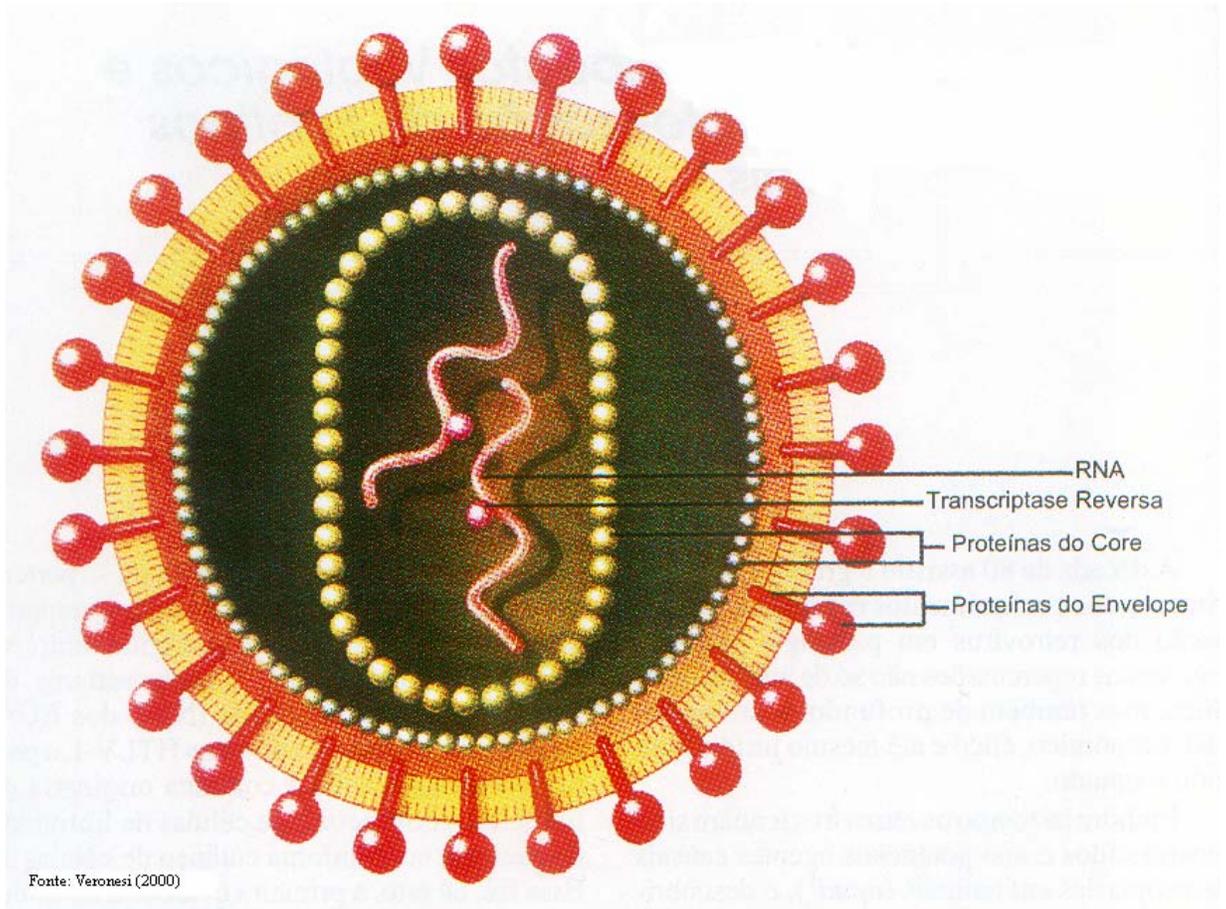


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura de um retrovírus humano.

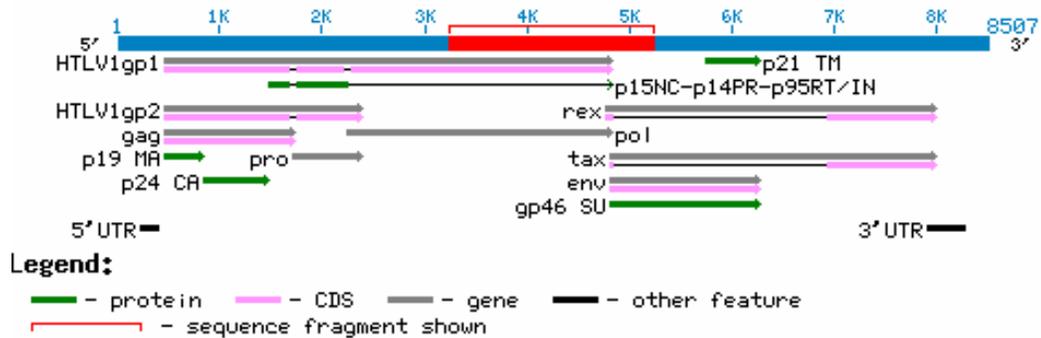


Figura 2 - Representação do genoma completo do HTLV-I (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 1998).

Os produtos da codificação desses genes provocam a produção de anticorpos específicos, permitindo as suas pesquisas por métodos sorológicos. (SEGURADO, 2001).

Os genomas provirais do HTLV-I e HTLV-II exibem homologia genética de 65% e, no curso de suas infecções, há codificação de produtos gênicos semelhantes (SODROSKI *et al.*, 1984).

1.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos dos vírus HTLV-I e II

Os vírus HTLV-I/II infectam, geralmente, células CD3 e CD4, causando destruição e/ou transformação nos linfócitos T (SEGURADO, 2001). A transmissão ocorre através de relações sexuais (MURPHY *et al.*, 1989), transfusões sanguíneas e produtos hemoderivados (SULLIVAN *et al.*, 1991), agulhas e seringas contaminadas (ROSENBLAT *et al.*, 1990), da mãe infectada para seu filho, especialmente através do aleitamento materno (SAGY *et al.*, 1990).

Apesar da infecção pelo vírus se instalar principalmente na infância, o desenvolvimento da doença ocorre em adultos após a quarta década de vida (BRASIL, 2003)

O HTLV-I tem sido associado a duas doenças: Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATLL) e Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I (PET/MAH), a qual leva à redução gradual da força muscular dos membros inferiores e queixas sensitivas leves do tipo parestesia nas pernas e nos pés (VERONESI, 2000). Relatos de casos têm mostrado a participação do HTLV-II em casos de mielopatias crônicas, clinicamente semelhantes aos de PET/MAH (HJELLE *et al.*, 1992).

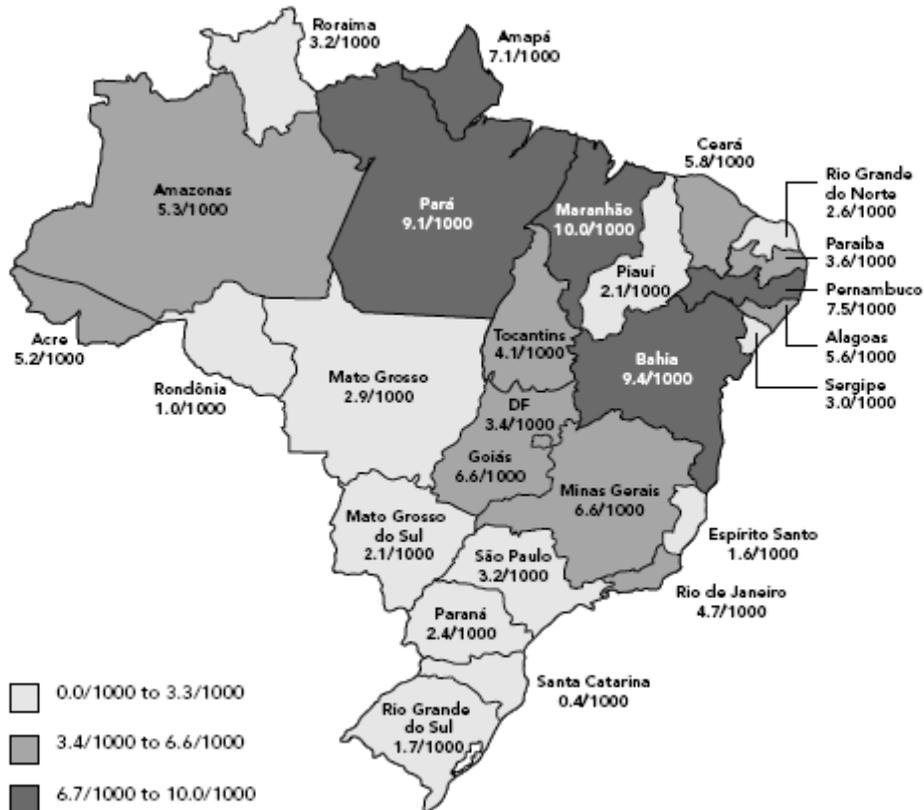
O vírus HTLV-I apresenta soroprevalências mais elevadas no sul do Japão (18% da população com anticorpos anti-HTLV-I circulantes) (MOROFUGI-HIRATA *et al.*, 1993), na região sudeste dos Estados Unidos (CANAVAGGIO *et al.*, 1990), nas ilhas do Caribe (WATTEL *et al.*, 1992), na América Central e na do Sul

(TRUJILLO *et al.*, 1992), em regiões da África habitada por pigmeus e, ainda, na Melanésia (GOUBAU *et al.*, 1993; YANAGIHARA *et al.*, 1990).

Já o HTLV-II tem sido encontrado nos Estados Unidos, nos países europeus, na América do Sul e no Vietnã (KHABBAZ *et al.*, 1991; ZANETTI; GALLI, 1992). Altas prevalências de anticorpos anti-HTLV-II também têm sido encontradas em populações indígenas das Américas.

No Brasil, as infecções pelo HTLV-I e II foram demonstradas em vários estudos (CORTES *et al.*, 1989; MOREIRA *et al.*, 1993; CASSEB *et al.*, 1994; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1997; CATALAN-SOARES *et al.*, 2005). Nestes estudos, as populações de risco foram identificadas como pacientes com AIDS, homossexuais, prostitutas, doadores de sangue, pacientes poli transfundidos e entre pacientes com linfomas e/ou com neuropatias periféricas (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; ARAUJO *et al.*, 1998).

Os testes para HTLV-I/II na triagem sorológica dos hemocentros foram introduzidos, primeiramente, no Japão em 1986, nos Estados Unidos em 1988, e no Brasil, apenas, em 1993, com o intuito de impedir a transmissão transfusional desses agentes virais em procedimentos hemoterápicos que empregam hemocomponentes celulares. Dessa maneira, tem-se identificado parcela significativa de portadores assintomáticos desses retrovírus em nosso meio (SEGURADO, 2001). Os índices de infecção entre doadores têm oscilado entre 0,4/1000 doações em Santa Catarina, 7,5/1000 doações em Pernambuco e 10/1000 doações no Maranhão (maior índice registrado) (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005) (Figura 3), bastante superiores aos índices encontrados no Canadá, onde a positividade entre doadores é de 0,48/100000 pessoas-ano (CHIAVETTA *et al.*, 2003).



Fonte: CATALAN-SOARES *et al.* 2005

Figura 3 – Prevalência sorológica para HTLV-I/II (/1000 doações) em doadores de sangue nas capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal.

1.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I e HTLV-II pode ser requisitado em diferentes situações clínicas (SEGURADO, 2001):

- 1) frente a um paciente que apresenta sintomas e/ou sinais sugestivos de doenças causadas por esses retrovírus, para confirmação da hipótese diagnóstica clínica;
- 2) na triagem diagnóstica de indivíduos expostos ao HTLV-I ou HTLV-II, como por exemplo, em comunicantes familiares ou parceiros sexuais de portadores dessas infecções;

- 3) na triagem compulsória de doadores assintomáticos de sangue ou órgãos.

1.3.1 Diagnóstico sorológico

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-I/II é feito, habitualmente, com testes sorológicos, baseados na pesquisa de anticorpos contra antígenos dos vírus presentes no soro do indivíduo infectado.

Vários testes para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV estão no mercado, e incluem: i) teste de aglutinação de partículas de látex ou gelatina, ii) ELISA - Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay, iii) RIPA -Radioimunoprecipitação, iv) IFI - Imunofluorescência Indireta e v) "Western blot". Esses dois últimos testes são usados como testes confirmatórios.

Devido a grande homologia entre os dois tipos de HTLV, a detecção de anticorpos anti-HTLV-I/II pelas provas sorológicas convencionais embora caracterize a infecção viral, não permite que se estabeleça o diagnóstico diferencial entre ambos os agentes.

Os testes sorológicos discriminatórios baseiam-se na pesquisa de anticorpos circulantes voltados a epitopos não compartilhados, que sejam específicos a um tipo de HTLV. Dessa maneira, são utilizados ensaios imunoenzimáticos que utilizam peptídeos sintéticos tipo-específicos, como antígenos (LAL *et al.*, 1991) ou, ainda, "Western blot" modificados, que incorporam antígenos recombinantes tipo-específicos aos lisados virais totais (HADLOCK *et al.*, 1992).

No entanto, é importante ressaltar que, em alguns casos, mesmo os testes sorológicos discriminatórios não são capazes de identificar o tipo de HTLV responsável pela infecção, dificultando, assim, o correto aconselhamento do indivíduo (SEGURADO, 2001; SANTOS *et al.*, 2003). Nesses casos são indicados a utilização de testes moleculares.

Além disso, recentemente foram descobertos mais dois tipos de HTLV: o HTLV-3 e o HTLV-4, que ao serem analisados através de testes sorológicos

confirmatórios utilizados atualmente, demonstraram resultados indeterminados ou falso-positivo HTLV-I, ou falso-positivo HTLV-II (CALATTINI *et al.*, 2005; SWITZER *et al.*, 2006).

1.3.2 Diagnóstico molecular

Os testes moleculares empregados para o diagnóstico dos vírus HTLV-I/II, baseiam-se na pesquisa de seqüências genômicas provirais em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) lisadas. Empregam-se técnicas de amplificação de segmentos genômicos, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica é capaz de identificar um único fragmento de DNA e amplificá-lo (multiplicá-lo) ao ponto de ser detectado. Com isso, o diagnóstico da infecção pelo HTLV não depende da resposta de anticorpos e o vírus pode ser detectado antes do aparecimento de qualquer sinal ou sintoma.

A PCR consiste na amplificação da seqüência alvo em 3 etapas: desnaturação do DNA, anelamento dos *primers*, e polimerização. A detecção do produto amplificado é realizada por eletroforese em gel de agarose, com visualização em luz ultravioleta.

Diferentemente de outros retrovírus, a carga viral circulante no sangue de indivíduos infectados por HTLV é muito pequena. Portanto, a sua detecção por métodos moleculares é realizada usando-se o DNA como ácido nucléico alvo.

Têm-se buscado amplificar as regiões mais conservadas do genoma viral (*pol* ou *tax*) utilizando *primers* consensuais, capazes de amplificar tanto as seqüências de HTLV-I como HTLV-II. Com a finalidade de aumentar tanto a sensibilidade como a especificidade, pode-se optar pela *nested* PCR (GALLEGO *et al.*, 2004) onde se procede uma segunda amplificação, utilizando como molde o produto da amplificação anterior e um par de *primers*, que se situe em posição interna ou flanqueada na seqüência do DNA proviral a do par de *primers* consensuais empregado na primeira amplificação.

A carga proviral de HTLV em indivíduos infectados pode ser determinada através da utilização da PCR em tempo real, uma técnica que permite o acompanhamento contínuo da amplificação, e com menor risco de contaminação que a PCR simples ou *nested* PCR (MACKAY *et al.*, 2002). Além disso, permite a visualização da detecção durante a amplificação, e vem sendo empregada para determinação da carga proviral do vírus HTLV devido a sua rapidez, precisão e acurácia.

Diferentes fluoróforos, moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, são usados na PCR em tempo real, (5'Nuclease, SYBR® Green, FRET, Molecular Beacons). As mais comuns são a 5'Nuclease e SYBR® Green (MACHAYI *et al.*, 2002).

A 5'Nuclease, também conhecida como TaqMan® (Figura 4), usa sondas fluorogênicas na reação de amplificação. A sonda é um oligonucleotídeo que possui um marcador fluorescente *reporter* no final 5' e um *quencher* próximo ao final 3'. Devido à proximidade dos dois no oligonucleotídeo, não há emissão de fluorescência. Mas durante a amplificação, a sonda que se hibridizou ao produto-alvo será clivada pela atividade da exonuclease da enzima *Taq* DNA polimerase, separando o *reporter* do *quencher*. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do produto-alvo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

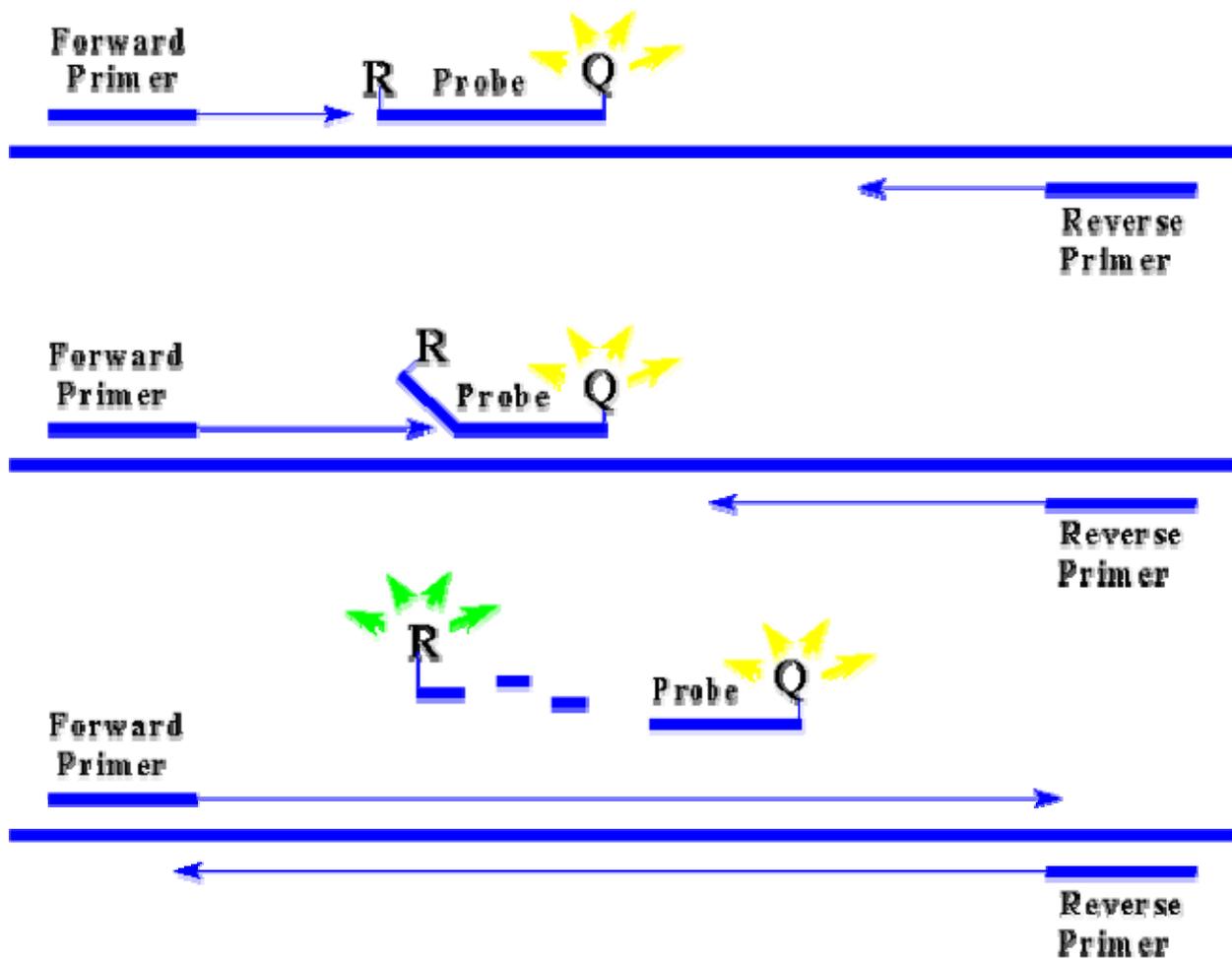


Figura 4 – Representação esquemática da amplificação do DNA utilizando o TaqMan® (RESEARCH INSTITUTE OF VIROLOGY AND BIOMEDICINE).

O SYBR® Green é um corante que quando se liga a moléculas de dupla fita de DNA, aumenta sua emissão fluorescente (Figura 5). A intensidade dessa fluorescência é proporcional à carga viral inicial do indivíduo (MACHAY *et al.*, 2002; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001). Uma das desvantagens do uso desse tipo de corante é que ele se liga a qualquer fita dupla de DNA e não apenas ao produto-alvo. Isso pode ser contornado, analisando-se a curva de dissociação do produto. Cada produto tem pico de temperatura de dissociação específico, o que diferencia o produto-alvo de

produtos inespecíficos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

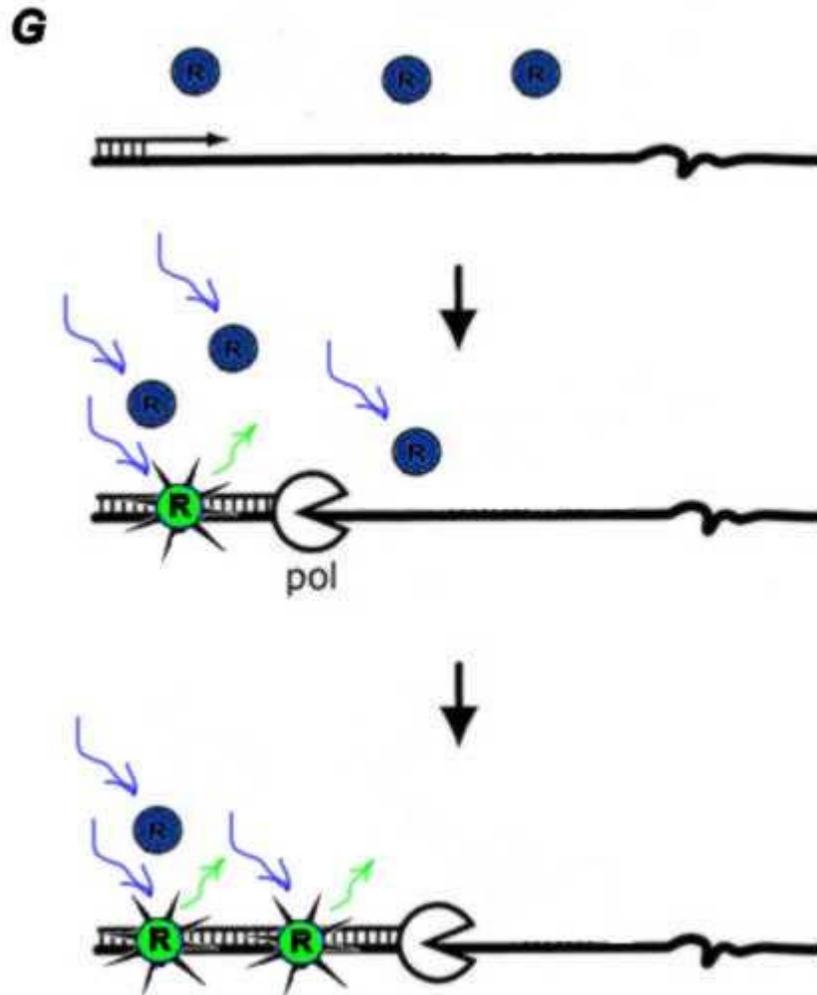


Figura 5 – Representação esquemática da amplificação do DNA utilizando o SYBR® Green (SCHIMIDTA, 2004).

2 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o desempenho da PCR em tempo real para a quantificação da carga viral dos indivíduos infectados pelo vírus HTLV-I em nossa região?

3 JUSTIFICATIVA

Estudos têm demonstrado que a carga viral de HTLV-I em pacientes que apresentam PET/MAH e Leucemia/Linfoma de células T do Adulto é significativamente maior que a daqueles indivíduos assintomáticos, o que leva a crer que há uma correlação entre o desenvolvimento das doenças e a carga viral (MONTANHEIRO *et al.*, 2005; TAKANOUCI *et al.*, 2003; DEHÉE *et al.*, 2002).

A PCR em tempo real já apresentou sucesso em quantificações de outras doenças (GUBALA, 2005; van der VELDEN *et al.*, 2003; IKEWAKI *et al.*, 2003). Desse modo, é possível que a carga viral de indivíduos infectados por HTLV-I seja determinada através da mesma.

A utilização desta técnica para obtenção da carga viral de HTLV-I irá permitir um melhor monitoramento clínico dos indivíduos infectados (DEHÉE *et al.*, 2002), assim como poderá identificar possíveis variantes virais na região (já que os *primers* utilizados são de seqüências mais comuns) e a utilização dos seus resultados poderá prever o início de doenças associadas, contribuindo para direcionar um tratamento adequado.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o desempenho da técnica da PCR em tempo real para o diagnóstico e quantificação da carga proviral dos indivíduos HTLV-I positivos, face a PCR qualitativa, visando a sua utilização na rotina laboratorial do Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE).

4.2 Específicos

- a) Identificar os indivíduos portadores do HTLV-I e II positivos através da PCR qualitativa.
- b) Identificar os indivíduos portadores do HTLV-I positivos através da PCR em tempo real.
- c) Determinar e comparar a sensibilidade e especificidade de ambas as técnicas usando o ELISA como padrão ouro.
- d) Quantificar a carga proviral de HTLV-I nos indivíduos selecionados através da PCR quantitativa em tempo real.

5 METODOLOGIA

5.1 População de estudo

A população de estudo foi caracterizada por uma amostragem não probabilística de conveniência, no período de novembro/2006 a abril/2007. A mesma foi composta por indivíduos (n=33) com sorologia reagente para anticorpos anti-HTLV, atendidos no ambulatório da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), bem como doadores de sangue (n=30), sabidamente negativos.

Após exame clínico-laboratorial padronizado, os indivíduos com sorologia reagente no ELISA, teste de rotina utilizado na triagem, foram selecionados para a realização da PCR qualitativa. Como controle dessa abordagem, utilizamos os doadores que apresentaram resultados não regentes.

5.2 Considerações éticas

Os indivíduos envolvidos nesse estudo tiveram participação voluntária e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 1). Os pacientes foram avaliados na Unidade de Hematologia do Hospital HEMOPE, no Ambulatório de Triagem Neonatal com apoio de consultores em Psicologia, Genética Médica e Serviço Social e responderam a um questionário semi-estruturado (Anexo 2). Aqueles que apresentaram resultados positivos para HTLV foram encaminhados para tratamento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM e HEMOPE (Anexos 3 e 4).

5.3 Coleta de sangue

O sangue foi coletado em um tubo contendo EDTA como anticoagulante, e utilizado para separação das células PBMC e obtenção do DNA.

5.4 Obtenção e contagem de células PBMC

O sangue coletado em tubo contendo EDTA foi centrifugado a 300 x g por 7 minutos e o plasma desprezado. O sangue restante diluído com PBS (salina tamponada com fosfato) 0,01 M, pH 7,2, em igual proporção (1:1). Em tubo Falcon de 15 mL foram colocados 2 mL de Ficoll (Amersham Pharmacia) e o sangue diluído em PBS depositado lentamente sobre o Ficoll. O tubo foi centrifugado por 30 minutos a 800 x g e em seguida o anel leucocitário formado, coletado e transferido para outro tubo de 15 mL onde foi lavado mais duas vezes com PBS, sendo submetido à centrifugação por 5 minutos a 300 x g entre as lavagens. O *pellet* formado foi ressuspensão com 1 a 3 mL de PBS. Essa suspensão foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem das células. Alíquotas contendo 10^6 células foram separadas, centrifugadas e o *pellet* armazenado a -20°C .

5.5 Extração do DNA a partir de células PBMC

A extração de DNA foi realizada pelo kit “Purification and Extration DNA GFX Column” (Amersham Pharmacia), seguindo as instruções do fabricante.

Às alíquotas contendo 10^6 células foi adicionado 500 μl de solução de extração, misturado por vórtex e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi transferida para a coluna GFX e centrifugada a 5000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.

A solução foi desprezada e a coluna recolocada no tubo. Mais uma vez, adicionou-se 500 µl de solução de extração à coluna GFX e centrifugou-se por 1 minuto a 5000 x *g* a temperatura ambiente. Descartou-se a solução esvaziando o tubo de coleta e colocou-se a coluna no tubo de coleta novamente. Adicionou-se 500 µl de solução de lavagem e centrifugou-se por 3 minutos a velocidade total. O tubo de coleta foi descartado e a coluna GFX transferida para um novo tubo de estéril.

Acrescentou-se 200µl de água bidestilada e autoclavada à coluna GFX, incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se por 1 minuto a 5000 x *g* a temperatura ambiente. A coluna GFX foi descartada e o tubo contendo o DNA extraído armazenado a -20°C.

5.6 Nested PCR qualitativa

O DNA foi submetido à PCR qualitativa, realizada em 2 etapas de amplificação.

Para o HTLV-I, na primeira amplificação, os seguintes *primers* foram utilizados:

SK110-*pol*: 5' - CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G - 3'

SK44-*tax*: 5' - GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG - 3'

Na segunda amplificação:

SK248-*env*: 5' - CTA GTC GAC GCT CCA GGA TAT GAC C - 3'

SK249-*env*: 5' - CAG ACC GCC ACC GGT ACC GCT CGG C - 3'

A mistura da reação de amplificação para o HTLV-I, com volume final de 20 µl, continha Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 5 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP (concentração final de 200 µmols para cada dnucleotídeo), 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 2 µl do DNA extraído do indivíduo. A primeira amplificação teve um protocolo de ciclagem: 95°C por 7 minutos (desnaturação), 1 minuto a 95°C, 72°C por 2 minutos e 55°C por 1,5 minuto (35

ciclos), e, por fim, uma extensão de 10 minutos a 72^oC. Já na segunda amplificação foi utilizada a mesma mistura de reação, trocando-se apenas os *primers* a serem usados e acrescentando-se o 2 µl do amplicon da primeira amplificação, diluído 1:100, seguindo-se uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94^oC; 30 ciclos de 94^oC por 1 minuto, 72^oC por 2 minutos e 58^oC por 1 minuto; seguido de uma extensão de 10 minutos a 72^oC (LEE *et al.*, 2004, modificado). O produto esperado era de 466 pb.

Para o HTLV-II, na primeira amplificação, os seguintes *primers* foram utilizados:

ET401-*env/tax*: 5' - CTC CTA TTC TGG GAA CAA GGG GGT TT - 3'

SK44-*tax*: 5' - GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG - 3'

Na segunda amplificação:

ET403-*env/tax*: 5' - GGC TGG GGA CTA AAC TGG GAT CCT GG - 3'

ET404-*env/tax*: 5' - CCA AAC ACG TAG ACG GGG GAT CC - 3'

A mistura de reação para amplificação do HTLV-II, também com volume final de 20 µl, continha Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 3,0 mM, 5 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de DNTP (concentração final de 200 µmols para cada nucleotídeo), 0,2 µl de DMSO, 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 2 µl do DNA extraído do indivíduo. A primeira e segunda reações seguiram a mesma ciclagem da primeira amplificação para HTLV-I. A segunda utilizou a mesma da mistura da reação trocando-se, apenas, os *primers* e utilizando o 2 µl do amplicon, da primeira amplificação, diluído 1:100, de acordo com (LEE *et al.*, 2004, modificado). O produto final esperado era de 821 pb.

5.7 PCR em tempo real

5.7.1 Curva padrão

O plasmídeo para construção da curva padrão utilizada no experimento foi, gentilmente, cedido pelo LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz na Bahia. Trata-se de um clone com dupla inserção, contendo uma porção do íntron 12 do gene da albumina e a região *pol* do genoma do HTLV-I, contida entre as posições 4708 e 4953 (DEHÉE *et al.*, 2002).

5.7.2 Quantificação do HTLV-I nas amostras

Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes *primers* (DEHÉE *et al.*, 2002).

SK110-*pol*: 5´- CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G -3´

SK111-*pol*: 5´- GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT – 3´

5.7.3 Quantificação da gene da albumina nas amostras

Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes *primers* (DEHÉE *et al.*, 2002).

Alb-S: 5´- GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T – 3´

Alb-AS: 5'- AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T – 3'

A mistura da reação usada nas duas reações utilizou 2 µl do DNA, 10 µM de cada *primer* e SYBR® Green Master Mix, em um total de 25 µl de reação.

Tanto o HTLV-I quanto a albumina, seguiram o seguinte protocolo de amplificação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 65°C (45 ciclos) e foram amplificados paralelamente no Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science), no Laboratório de Virologia do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami)/UFPE.

A quantificação da carga proviral de HTLV-I foi calculada segundo a seguinte fórmula: (média do número de cópias de HTLV-I / média do número de cópias da albumina) x 2 x 10⁶ e expressos em número de cópias/ 10⁶ células PBMC (DEHÉE *et al.*, 2002).

5.8 Análise dos dados

O limite de detecção do DNA utilizando a PCR em tempo real para a quantificação da carga proviral do HTLV-I foi analisada através de diluições seriadas (10⁵ a 10⁰). A sensibilidade e a especificidade da PCR em tempo real foram realizadas de acordo com Ferreira e Ávila (2001).

Tabela 1 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

TESTES	DOENÇA – Diagnóstico verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Positivos verdadeiros A	Positivos falsos B
Negativo	Negativos falsos C	Negativos verdadeiros D

Segundo Ferreira & Ávila (2001)

A sensibilidade (S) do teste foi dada pela percentagem de positivos entre os indivíduos sabidamente chagásicos. A especificidade (E), pela percentagem de negativos, entre indivíduos não chagásicos, conforme as fórmulas a seguir:

$$S = \frac{A}{A + C}$$

$$E = \frac{D}{B + D}$$

Foi utilizado o pacote EPI-INFO 6.04 para análise dos dados e cálculo de intervalos de confiança, com grau de confiança de 95%.

6 RESULTADOS

Foram analisadas 63 amostras: 33 amostras apresentaram sorologia reagente para HTLV e 30 amostras foram não reagentes para HTLV.

O grupo de indivíduos com sorologia reagente era constituído de 27 mulheres com idade média de 47 anos, e 6 homens com idade média de 48 anos. O grupo de indivíduos com sorologia não reagente era composto de 26 homens com idade média de 35 anos e 4 mulheres com idade média de 35 anos.

6.1 PCR Qualitativa para HTLV-I e II

Os resultados da análise da PCR qualitativa para HTLV (Figuras 5 e 6) estão demonstrados na Tabela 2. Todos os indivíduos com sorologia não reagente (n=30) se mostraram também não reagentes na PCR qualitativa. Do grupo de indivíduos com sorologia reagente (33), 4 apresentaram resultados não reagente na PCR qualitativa e 1 foi diagnosticado como HTLV-II positivo. A sensibilidade da PCR qualitativa foi de 87,9% (IC 95%: 70,1 – 95,0%) e a especificidade foi de 100% (IC 95%: 85,9 – 100,0%).

Tabela 2 – Resultados da PCR Qualitativa para HTLV

PCR QUALITATIVA	SOROLOGIA REAGENTE PARA HTLV	
	Reagente	Não reagente
Positivo	29	0
Negativo	4	30



Figura 6 – Amostra representativa da PCR qualitativa para HTLV-I. Linha 1 – padrão de peso molecular de 100pb (Biolabs); linhas 2, 3, 10 e 14 – amostras com resultados negativos; linhas 4 a 9, 11 a 13 – amostras com resultados positivos; linha 15 – controle positivo e linha 16 – controle negativo.

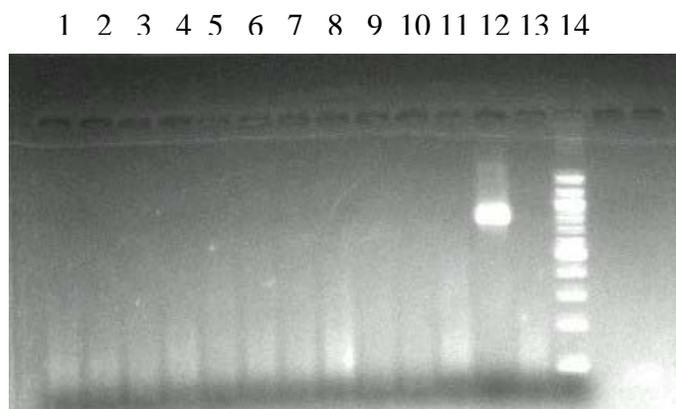


Figura 7 – Amostra representativa da PCR qualitativa para HTLV-II. Linha 1 a 11 – amostras negativas; linha 12 – controle positivos; linha 13 – controle negativo e linha 14 – padrão de peso molecular de 100pb (Biolabs).

6.2 Gene da Albumina

A construção da curva padrão para a albumina foi realizada amplificando-se diluições seriadas do plasmídeo, em triplicata, que iam de 10^5 a 10^0 cópias/reação (Figura 7). Durante a fase exponencial da reação, na porção linear da curva, o software do equipamento, coloca o *threshold*. O ponto da curva que intercepta esse *threshold* é chamado de ciclo *threshold* (C_t). A fluorescência emitida foi plotada contra o C_t , gerando o gráfico da curva padrão (Figura 8). O plasmídeo com diluição contendo 10^3 cópias/reação tinha um C_t de $22,27 (\pm 0,23)$. Cada produto de amplificação tem uma temperatura de dissociação específica. Após a amplificação, fizemos a dissociação dos produtos elevando-se a temperatura. A temperatura de dissociação da albumina foi de $78,9^{\circ}\text{C}$ (Figura 9).

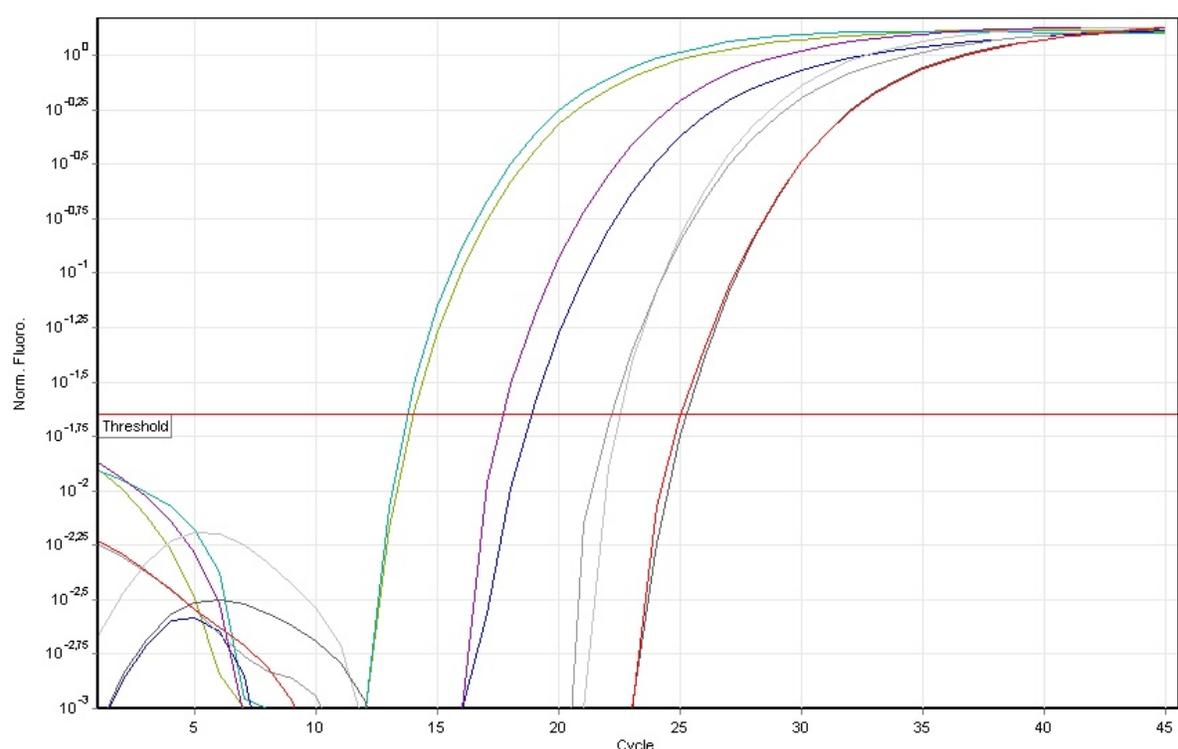


Figura 8 – Amplificação da curva padrão de albumina, mostrando a linha *threshold*, e os padrões de 10^5 a 10^2 .

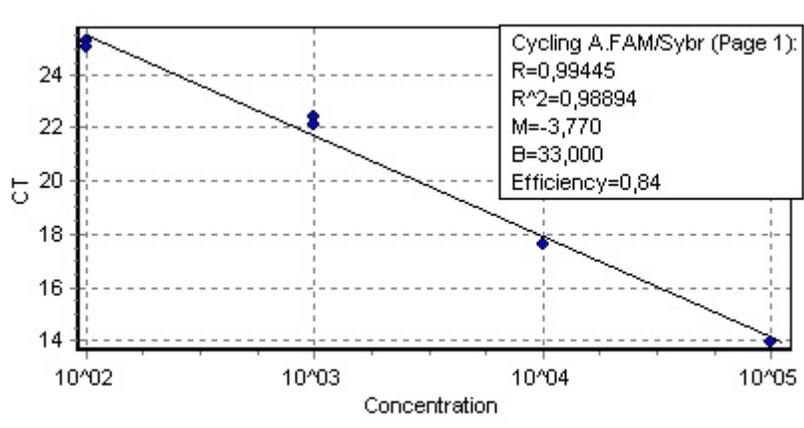


Figura 9 – Regressão linear da curva padrão de albumina.

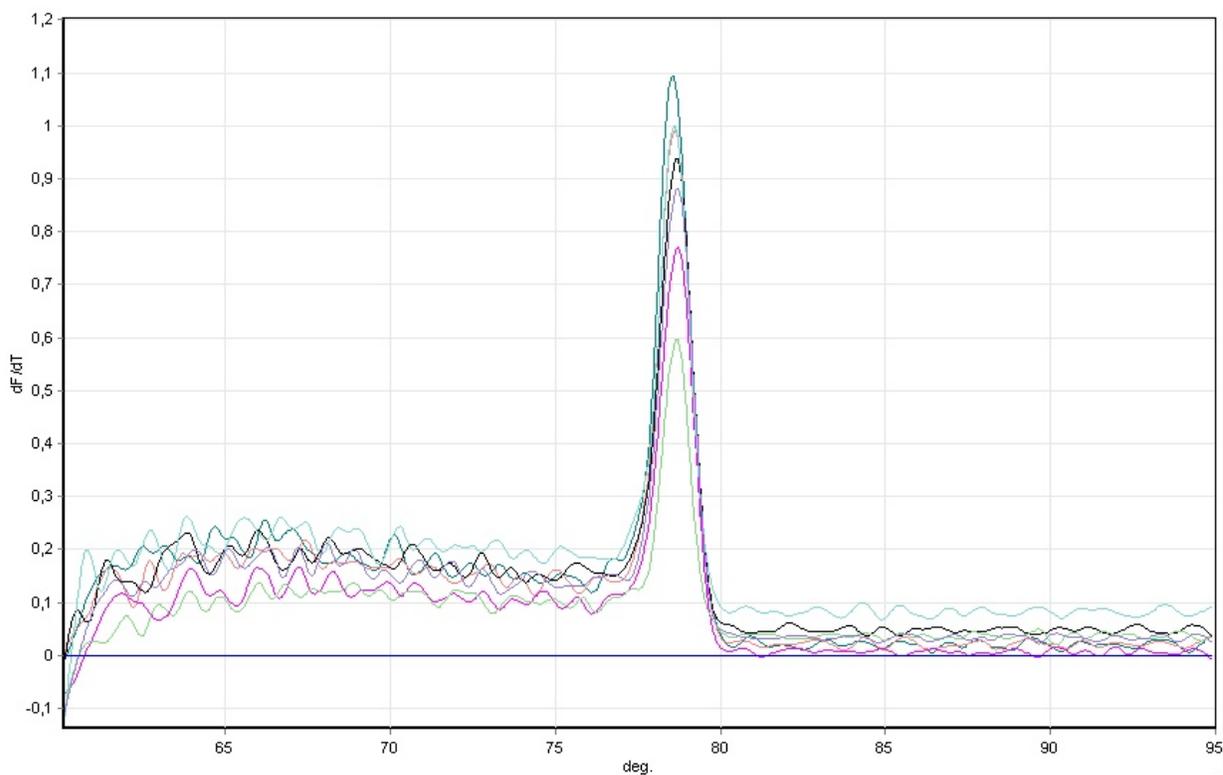


Figura 10 – Curva de dissociação dos padrões de albumina.

6.3 HTLV-I

A construção da curva padrão para HTLV-I também foi realizada amplificando-se diluições seriadas do plasmídeo, em triplicata, que iam de 10^5 a 10^0 cópias/reação (Figura 10). A fluorescência plotada contra o C_t , gerou o gráfico da curva padrão (Figura 11). O plasmídeo com diluição contendo 10^3 cópias/reação tinha um C_t de 22,59 ($\pm 0,09$). Após a amplificação, realizamos a dissociação dos produtos elevando-se a temperatura. A temperatura de dissociação do HTLV-I foi de $78,39^\circ\text{C}$ (Figura 12). O limite inferior de detecção do teste foi observado como sendo de 10 cópias/reação.

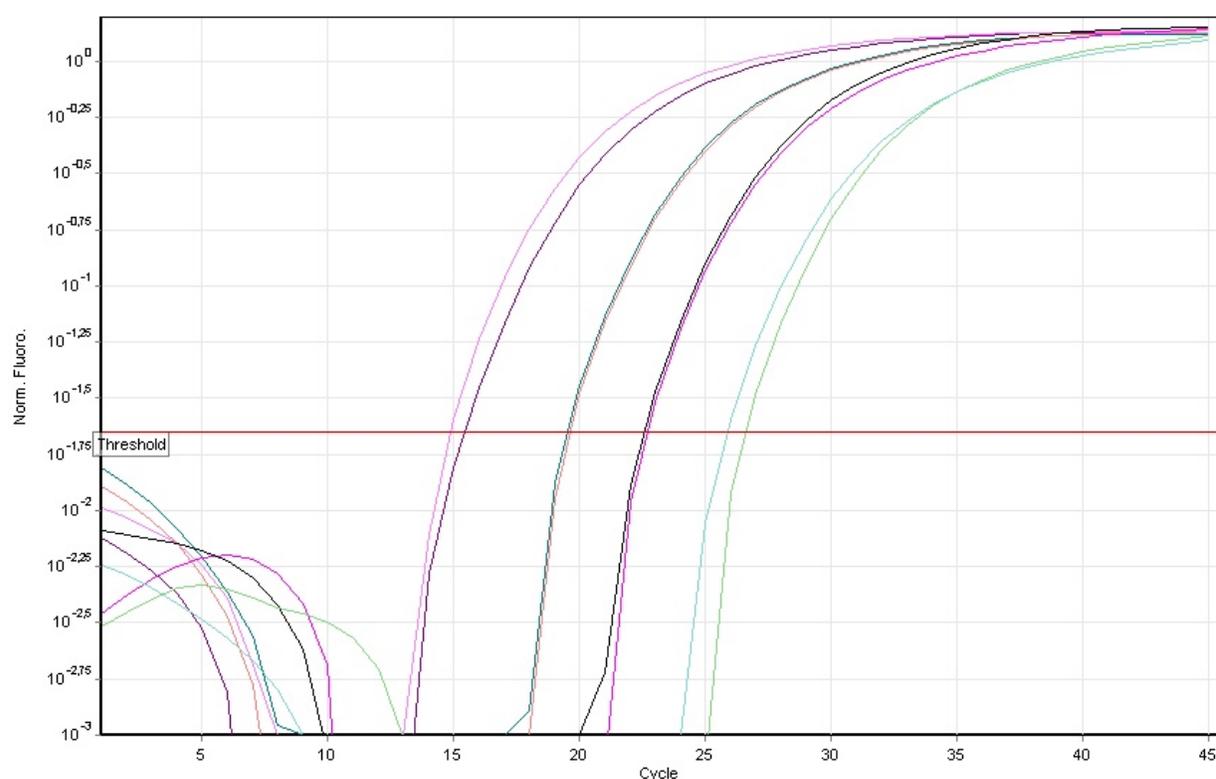


Figura 11 – Amplificação da curva padrão de HTLV-I, mostrando a linha *threshold*, e os padrões de 10^5 a 10^2 .

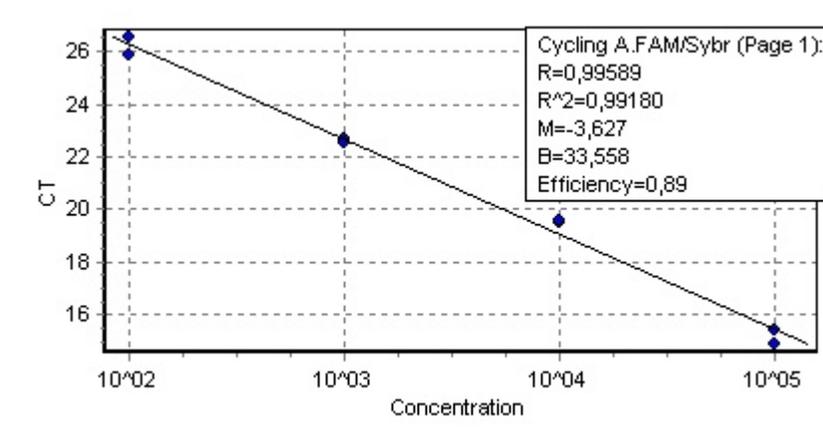


Figura 12 – Regressão linear da curva padrão de HTLV-I.

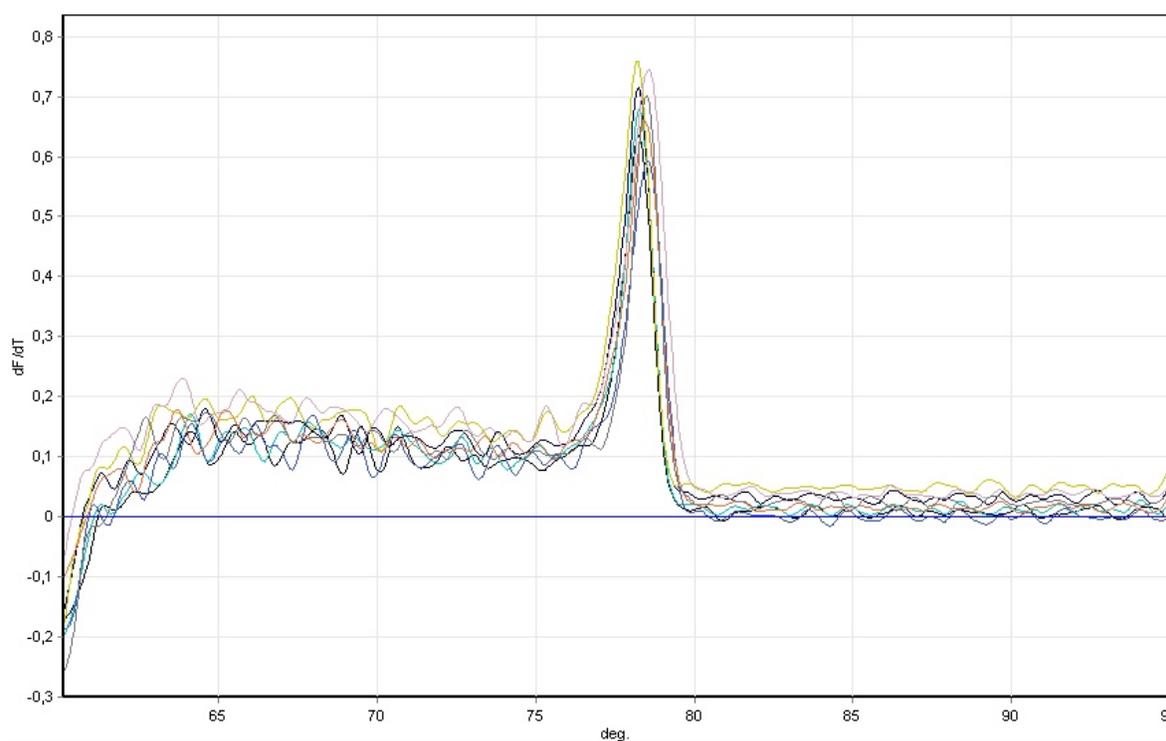


Figura 13 – Curva de dissociação dos padrões de HTLV-I.

6.4 Carga proviral de HTLV-I

Uma vez calculada a curva padrão, o software automaticamente fez a quantificação do número cópias de DNA de HTLV-I ou de albumina, relacionando o C_t da amostra com o C_t da curva padrão. Dessa maneira, foi calculada a carga proviral de HTLV-I pela seguinte fórmula: (média do número de cópias de HTLV-I / média do número de cópias da albumina) x 2 x 10^6 . Os resultados foram expressos em número de cópias/ 10^6 células PBMC.

A carga proviral dos indivíduos reagentes na sorologia (n=33) foi quantificada através da PCR em tempo real. A carga proviral variou entre 13 cópias/ 10^6 células PBMC e 343820 cópias/ 10^6 células PBMC (Figura 13). Dos 30 indivíduos que foram não reagentes na sorologia, um mostrou uma carga proviral de 308 cópias/ 10^6 . A sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real foram de 100% (IC 95%: 86,7 – 100,0%) e 96,67% (IC 95%: 80,9 – 99,8%), respectivamente (Tabela 3). Analisando os dados obtidos não houve diferença significativa entre o desempenho da PCR qualitativa e da PCR em tempo real.

Tabela 3 – Resultados da PCR em tempo real (quantitativa) para HTLV-I

PCR em Tempo Real para HTLV-I	SOROLOGIA REAGENTE PARA HTLV	
	Reagente	Não reagente
Positivo	32	1
Negativo	0	29

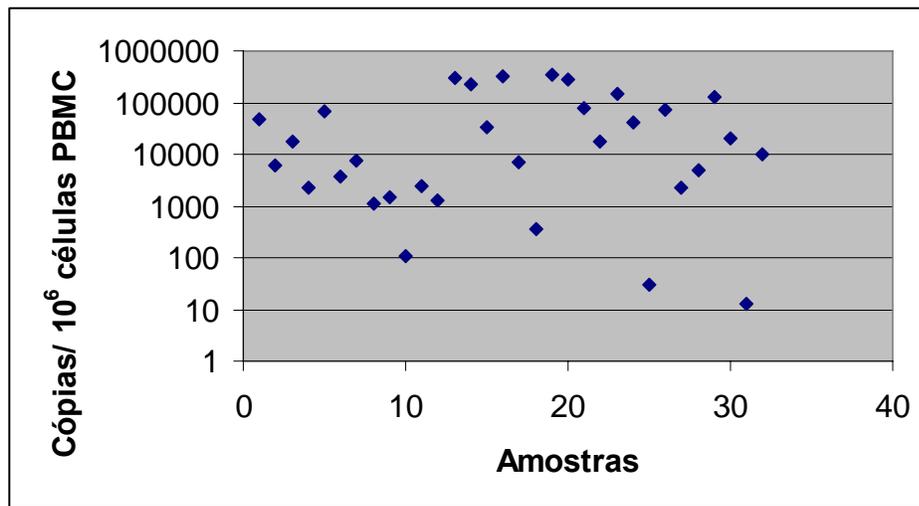


Figura 14 – Dispersão das cargas provirais dos indivíduos HTLV-I positivos na PCR em tempo real.

7 DISCUSSÃO

O HTLV (do inglês Human T-cell lymphotropic virus) é um retrovírus com distribuição mundial. Estima-se que haja no mundo, cerca de 15 a 20 milhões de pessoas infectadas por ele (PROIETTI *et al.*, 2005). No Brasil, o Ministério da Saúde acredita que 750.000 pessoas sobrevivam com o vírus (Brasil, 2003). Em Pernambuco especificamente, estudo realizado por Catalan-Soares *et al.* (2005), identificou taxa de prevalência de 7,5 em mil doações de sangue.

A transmissão do HTLV pode se dar através de transfusão de sangue contaminado pelo vírus, compartilhamento de objetos cortantes ou perfurantes que contenham sangue contaminado, pelo leite materno de mãe infectada pelo vírus ou, ainda, por meio de relações sexuais não protegidas (MURPHY *et al.*, 1989; SULLIVAN *et al.*, 1991; ROSENBLAT *et al.*, 1990; SAGY *et al.*, 1990; BRASIL, 2003; VERONESI *et al.*, 2000).

As principais doenças associadas à infecção por HTLV-I são a Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATLL) e a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-I (PET/MAH).

Na ATL as manifestações clínicas se caracterizam por lesões de pele persistentes, hepatoesplenomegalia, presença de linfócitos em forma de *flower cells*, entre outras. A média de idade para aparecimento da doença é de 40 anos e a sobrevida desses pacientes, na maioria dos casos, não ultrapassa 9 meses (BRASIL, 2003).

A PET/MAH caracteriza-se pelo acometimento progressivo de fraqueza muscular e espasticidade nos membros inferiores, distúrbios de esfíncter e sensitivos (BRASIL, 2003).

Apenas 3 a 5% dos infectados com vírus HTLV-I irão desenvolver algum tipo de afecção (KAPLAN *et al.*, 1990; BRASIL, 2003; ORLAND *et al.*, 2003).

Desconhece-se a proporção de pessoas infectadas pelo HTLV-II que irá desenvolver alguma das doença associadas, em qualquer época das suas vidas. Acredita-se, entretanto, que esta proporção deve ser menor que entre a dos infectados pelo HTLV-1 (BRASIL, 2003)

Todavia, pessoas assintomáticas podem infectar outros indivíduos, daí a importância de se saber quem tem o vírus, independentemente de ter ou não algum sintoma.

Uma vez diagnosticada a infecção pelo vírus, o Ministério da Saúde recomenda que o acompanhamento dos pacientes assintomáticos seja feito de 6 em 6 meses ou de 12 em 12 meses (BRASIL, 2003)

O diagnóstico laboratorial de triagem da infecção é feito através de exames sorológicos, principalmente pelo método de ELISA, com confirmação através do método de “Western blot” para definição do tipo do vírus (I ou II).

Nos casos em que o “Western blot” for inconclusivo (não determinar o tipo do vírus), deve utilizar-se os métodos moleculares (BRASIL, 2003; SWITZER *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2003) que se caracterizam, especialmente o PCR, pela elevada especificidade (GALLEGO *et al.*, 2004).

A PCR em tempo real permite a detecção e quantificação de seqüências alvo pela medida contínua do acúmulo ou redução dos sinais de fluorescência durante a amplificação da reação. Ela é realizada em sistema fechado, diminuindo o risco de contaminação e eliminando a etapa de eletroforese em gel como na PCR comum (GUNSON *et al.*, 2006). Durante a PCR em tempo real, mais precisamente durante o anelamento dos *primers* e a extensão da seqüência alvo, quantidades maiores de SYBR® Green ligam-se às fitas duplas de DNA sintetizadas, o que leva a um aumento de emissão de fluorescência. Quando o DNA é novamente desnaturado no ciclo da PCR, o SYBR Green desprende-se, diminuindo a emissão de fluorescência (WATZINGER *et al.*, 2006).

Segundo Gunson *et al.* (2006) essa propriedade do SYBR® Green de ligar-se a fitas duplas tem vantagens e desvantagens. Ela permite que haja pequenos erros de pareamento de bases durante a extensão, porém, mesmo assim, é capaz de ligar-se e emitir fluorescência. Isso é de grande valia quando estudamos vírus, pois mesmo mutações ou mudanças em seqüências de regiões conservadas podem levar a erros de pareamento de sondas, ocasionando resultados falso-negativos. Com o SYBR® Green esta possibilidade ainda existe, mas é bastante

reduzida se comparada a ensaios que utilizam sondas. Contudo, essa mesma propriedade de ligar-se a qualquer dupla fita diminui a especificidade da reação. Pode ocorrer emissão de fluorescência mesmo quando a amostra é negativa devido à ligação do SYBR® Green a dímeros de *primer* (GUNSON *et al.*, 2006; WATZINGER *et al.*, 2006). Para evitar erros de análise, utilizamos a curva de dissociação, a qual permite discriminar tamanhos de amplicons de dímeros de *primers*.

A utilização do SYBR® Green, no nosso estudo, foi baseada no fato de ser um ensaio de menor custo, e de não necessitar de uma sonda específica. Os *primers* utilizados amplificam a região *pol* do vírus HTLV-I, por ser uma região conservada e já ser utilizada para a pesquisa de vírus em vários estudos (TOSSWILL *et al.*, 1998; MONTANHEIRO *et al.*, 2005; DEHÉE *et al.*, 2002).

A construção da curva padrão de HTLV-I foi realizada através de diluições seriadas do plasmídeo, que iam de 10^5 a 10^0 . Após a realização da PCR em tempo real com as diluições em triplicatas, observou-se um limite inferior de detecção de 10 cópias/reação, onde a diluição de 10^3 cópias teve um C_t de 22,59, confirmando resultados anteriores de Lee *et al.* 2004.

No grupo com sorologia não reagente para HTLV, nosso controle, todos os 30 indivíduos também se mostraram não reagente na PCR qualitativa. Entretanto, um deles obteve na PCR em tempo real uma carga proviral de 308 cópias/ 10^6 PBMC. Os testes da PCR qualitativa e da PCR em tempo real foram repetidos e os resultados foram reprodutíveis.

Os resultados da carga proviral dos indivíduos com sorologia reagente variou entre 13 a 343820 cópias/ 10^6 PBMC, resultados esses corroborados por outros estudos (LEE *et al.*, 2004; NAGAI *et al.*, 1998; MATSUZAKI *et al.*, 2001).

Em consonância com outros (MONTANHEIRO *et al.*, 2005; MATSUZAKI *et al.*, 2001; NAGAI *et al.*, 1998), nosso estudo também observou que os indivíduos com PET/MAH tiveram carga proviral mais elevada que a dos indivíduos assintomáticos.

Todavia, ainda não foi evidenciado cientificamente que exista uma relação inversa, ou seja, que os portadores de HTLV-I com alta carga proviral e sem doença clínica estabelecida estejam mais sujeitos a desenvolver as doenças associadas ao vírus. Para isto, conforme sugerido por Montanheiro *et al.* (2005) seria necessário um acompanhamento a longo prazo dos portadores assintomáticos.

Caso se estabeleça que os portadores de HTLV-I com carga proviral elevada sejam mais freqüentemente acometidos por leucemias e doenças neurológicas quando comparados àqueles com baixa carga viral, seremos levados a questionar a atual orientação de acompanhamento do Ministério da Saúde que estaria dando um tratamento uniforme aos desiguais entre si. Nessa eventualidade, dever-se-ia adotar, em relação a eles, uma estratégia de acompanhamento clínico diferenciada na expectativa de que um diagnóstico e uma terapêutica mais precoces das doenças clínicas possam resultar em melhor prognóstico.

8 CONCLUSÕES

1. Não houve diferença significativa na sensibilidade e na especificidade entre a PCR qualitativa e a PCR em tempo real na identificação do vírus HTLV-I. No entanto, verificou-se a ocorrência de resultados falso-negativos em pouco mais de 10% dos testes com PCR qualitativa. Diante da reprodução dessa observação em amostragem mais ampla, a PCR em tempo real assumiria um papel relevante na identificação do vírus e na determinação simultânea da carga proviral.
2. O fato da PCR em tempo real identificar o tipo viral indica que essa técnica poderá ser implementada na rotina do HEMOPE, como teste confirmatório e ainda terá a vantagem de quantificar a carga proviral dos portadores de HTLV-I.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. Q. *et al.* HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey. HAM/TSP Brazilian Study Group. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, New York, v.19, n.5, p.536-541, 1998.

BRASIL. Secretaria em Vigilância da Saúde. Programa Nacional de DST Aids. *Guia de manejo clínico de HTLV*. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

CALATTINI, S. *et al.* Discovery of a new human T-cell lymphotropic vírus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*, London, v.2, n.1, p.30, 2005.

CANAVAGGIO, M. *et al.* The prevalence of antibody to HTLV-I/II in United States plasma donors and in United States and French hemophiliacs. *Transfusion*, Philadelphia, v.30, p. 780-782, 1990.

CASSEB, J. S. R. *et al.* Soroprevalência de anticorpos anti-HTLVI/II em indivíduos assintomáticos infectados pelo HIV em São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.27, n.1, p.29, 1994.

CATALAN-SOARES, B. *et al.* Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban áreas in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.21, n.3, p.926-931, 2005.

CHIAVETTA, J.Á. *et al.* Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990–2000. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, v.169, n.8, p.767-773, 2003.

CORTES, E. *et al.* HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infections in high-risk groups in Brazil. *New England Journal of Medicine*, Boston, v.320, n.15, p.953-958, 1989.

DEHÉE, A. *et al.* Quantitation of HTLV-I proviral load by TaqMan real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.102, n.1-2, p.37-51, 2002.

FERREIRA, A. W. ; ÁVILA, S.L.M. Sorologia: importância e parâmetros. In:_____. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 2001, p.1-8.

GALLEGO, S. *et al.* Usefulness of a Nested-Polymerase Chain Reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic vírus type I/II. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.99, n.4, p.377-380, 2004.

GALVÃO-CASTRO, B. *et al.* Distribution of human T-lymphotropic vírus type 1 among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, Philadelphia, v.37, p.242-243, 1997.

GUNSON, R. N.; COLLINS, T. C.; CARMAN, W. F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.35, p.355-367, 2006.

GOUBAU, P. *et al.* HTLV-II seroprevalence in pigmies across Africa since 1970. *AIDS Research and Human Retroviruses*, New York, v.9, n.8, p.709-713, 1993.

GUBALA, A. J. Multiplex real-time PCR detection of *Vibrio cholerae*. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v.65, n.2, p.278-293, 2005

HADLOCK, K.G. *et al.* Cloning and analysis of a recombinant antigen containing an epitope specific for human T cell lymphotropic virus type II. *Blood*, New York, v.79, n.10, p.2789-2796, 1992.

HJELLE B. *et al.* Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet*, Minneapolis, v.339, p.645-646, 1992.

KAMIHIRA, S. *et al.* Significance of HTLV-I proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-I-infected cell count. *Clinical Laboratory Hematology*, Oxford, v.25, p.111-117, 2003.

KAPLAN, J. E. *et al.* The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, Hagerstown, v.3, p.1096-1101, 1990.

KHABBAZ, R. F. *et al.* Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in a cohort of New York intravenous drug users: an old infection? *Journal of Infectious Diseases*, New York, v.163, n.2, p.252-256, 1991.

IKEWAKI, J. *et al.* Real-Time PCR assay compared to Nested PCR and antigenemia assays for detection cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.41, n.9, p.4382-4387, 2003.

LAL, R. B. *et al.* Synthetic peptide-based immunoassays for distinguishing between human T-cell lymphotropic virus type I and II infections in seropositive individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.29, n.10, p.2253-2258, 1991.

LEE, T-H; CHAFETS, D. M.; BUSCH, M. P.; MURPHY, E. L. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.31, p.275-282, 2004.

MACHAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MATSUZAKI, T. *et al.* HTLV-I proviral load correlates with progression disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *Journal of Neurovirology*, Philadelphia, v.7, p.228-234, 2001.

MONTANHEIRO, P. A. *et al.* Human T-cell lymphotropic vírus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Sao Paulo, v.38, n.11, p.1643-1647, 2005.

MOREIRA, E. D. *et al.* Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I in Northeastern Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, Hagerstown, v.6, p.959-963, 1993.

MOROFUJI-HIRATA, M. *et al.* Prevalence of antibody to human T-cell lymphotropic virus type I in Okinawa, Japan, after an interval of 9 years. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v.137, p.43-48, 1993.

MURPHY E. L. *et al.* Sexual transmission of human T Lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v.111, p.555-560, 1989.

NAGAI, M. *et al.* Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of Neurovirology*, Philadelphia, v.4, p.586-593, 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Human T-lymphotropic virus 1*. Bethesda, 1998. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 29 de abril de 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Quantitative molecular methods for infectious diseases: proposed guidelines. 2001.

ORLAND, J. R. *et al.* Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV outcomes study. *Neurology*, Hagerstown, V.61, P.1588-1594, 2003.

POMBO DE OLIVEIRA, M. S. *et al.* Geographic diversity of adult T-cell leukemia/lymphoma in Brazil. The Brazilian ATLL Study Group. *International Journal of Cancer*, New York, v.83, n.3, p.291-298, 1999.

PROIETTI, F.A. *et al.* Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, Basingstoke, v.24, p.6058-6068, 2005.

RESEARCH INSTITUTE OF VIROLOGY AND BIOMEDICINE. Real time – PCR. Wien. Disponível em: <<http://www.vu-wien.ac.at/i123/VIROKURS/RT-PCRkurs.html>>. Acesso em: 10 de abril de 2007.

ROSENBLAT, J. D. *et al.* A clinical, hematologic and immunologic analysis of 21 HTLV-II-infected intravenous drugs users. *Blood*, New York, v.76, p.409-417, 1990.

SAGY, E. *et al.* Perinatal infection of human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of ATL/L. DNA amplification of specific HTLV-I sequence. *Cancer*, Hoboken, v.66, p.1993-1997, 1990.

SANTOS, T. J. T. *et al.* Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic vírus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v.7, n.2, p.202-209, 2003.

SCHIMIDTA, M. Real-time PCR. Poznan, 2004. Disponível em: <<http://www.au.poznan.pl/~mschmidt/realpisuar.htm>>. Acesso em: 10 de abril de 2007.

SEGURADO, A. A. *et al.* Laboratory characterization of human T-cell lymphotropic vírus types 1 (HTLV-1) na 2 (HTLV-2) infections in blood donors from São Paulo, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v.57, n.2, p.142-148, 1997.

SEGURADO, A. A. C. Infecção por HTLV-I e HTLV-II. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro: 2ª. ed, Guanabara Koogan, p.103-110, 2001.

SODROSKI, J. *et al.* Sequence of the envelope glycoprotein gene of type II human T lymphotropic virus. *Science*, Washington, v.225, p.421-424, 1984.

SULLIVAN, M. T. *et al.* Transmission of human T lymphotropic virus types I and II by blood transfusion. A retrospective study of blood recipients (1983 through 1988). *Archives of Internal Medicine*, Chicago, v.151, p.2043-2048, 1991.

SWITZER, W. M. *et al.* Serologic testing for human T-lymphotropic virus-3 and -4. *Transfusion*, Philadelphia, v.46, n.9, p.1647-1648, 2006.

TAKENOUCHI, N. *et al.* Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy tropical spastic paraparesis. *Journal of Neurovirology*, Philadelphia, v.9, n.1, p.29-35, 2003.

TOSSWILL, J. H. C. *et al.* Quantification of proviral DNA load in human T-cell leukaemia virus type I infections. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.75, p.21-26, 1998.

TRUJILLO, J. M. *et al.* Soroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Research and Human Retroviruses*, Larchmont, v.5, p.651-657, 1992.

van der VELDEN, V. H. *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, London, v.14, n.6, p.1013-1034, 2003.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Retrovírusos humanos: doenças associadas ao HTLV: etiologia, patogenia, patologia clínica, tratamento, prevenção*. 1ª. Ed, São Paulo: Atheneu, 2000.

WATTEL, E. *et al.* Human T lymphotropic virus (HTLV) type I and II DNA amplification in HTLV-I/II seropositive blood donors of French West Indies. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v.165, p.369-372, 1992.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, Oxford, v.27, p.254-298, 2006.

YANAGIHARA, R. *et al.* Isolation of HTLV-I from members of a remote tribe in New Guinea. *New England Journal of Medicine*, Boston, v.323, n.14, p.993-994, 1990.

ZANETTI, A. R.; GALLIC, C. Soroprevalence of HTLV-I and HTLV-II. *New England Journal of Medicine*, Boston, v.326, n.26, p.1783-1784, 1992.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO**QUESTIONÁRIO**

Projeto: Avaliação da técnica de PCR em tempo real no diagnóstico da infecção pelo HTLV-I

NOME COMPLETO: _____

IDADE: _____

SEXO: _____

DOADOR: SIM NÃO

HÁ QUANTO TEMPO É DOADOR (ANOS)? _____

JÁ TEVE ALGUM DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR HTLV? SIM NÃO

QUANDO? _____

JÁ FEZ ALGUM TESTE CONFIRMATÓRIO PARA A INFECÇÃO POR HTLV?

- Western blot HTLV-I positivo
- Western blot HTLV-I I positivo
- Western blot indeterminado
- Western blot negativo
- PCR HTLV-I positivo
- PCR HTLV-I negativo
- PCR HTLV-II positivo
- PCR HTLV-II negativo

Observações:.....

.....

.....

.....

APÊNDICE 2 – Artigo a ser enviado para a Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Artigo a ser enviado para a Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Avaliação da técnica PCR em tempo real no diagnóstico da infecção pelo HTLV-I, em indivíduos atendidos no Hospital de Hematologia da Fundação HEMOPE

Bruna Cavalcanti Arruda^{1,2}, Lucas Brandão³, Rafael Guimarães³, Paulo Roberto Souza³, Rodrigo Alves Lira¹, Paula Loureiro², Ana Clara Gurgel²,
Wayner V Souza¹, Yara M Gomes¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), ²Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), ³Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami-LIKA/UFPE

Autor correspondente: Yara M. Gomes

Av. Moraes Rego, sn, Cidade Universitária, CEP: 50.670-420, Recife-PE, Brasil

Tel. 55-81-2101-2559, e-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Resumo

No presente estudo, 63 amostras provenientes do Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE) foram analisadas através do ELISA. Os resultados mostraram que 33 indivíduos apresentaram sorologia reagentes para o HTLV-I, e 30 amostras foram não reagentes, constituindo o grupo controle. Essas amostras foram analisadas para identificação do tipo viral (I ou II) e determinação da carga proviral, utilizando a PCR qualitativa e a PCR em tempo real, respectivamente. A sensibilidade da PCR qualitativa, para identificação do tipo viral, em relação à sorologia foi de 87,5% (IC 95%: 70,1 – 95,9%) e a especificidade foi de 100% (IC 95%: 85,9 – 100,0%). Já a sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real foram de 100% (IC 95%: 86,7 – 100,0%) e 96,67% (IC 95%: 80,9 – 99,8%), respectivamente. A carga proviral dos indivíduos reagentes na sorologia variou entre 13 cópias/ 10^6 células PBMC e 343820 cópias/ 10^6 células PBMC. Nosso estudo também observou que os indivíduos com PET/MAH tiveram carga proviral mais elevada que a dos indivíduos assintomáticos.

Palavras chaves: Vírus Linfotrófico T Humano. Infecções por HTLV-I, diagnóstico molecular, Reação em Cadeia da Polimerase.

Abstract

The HTLV proviral load in infected individuals can be determined through real time PCR, a faster and less contaminating method than the simple PCR or the nested PCR. We analyzed 63 samples, from the Fundação HEMOPE, which 33 were samples from HTLV seropositive individuals and 30 samples from blood donors, negative to HTLV-1, to determine the viral type and the proviral load, by qualitative PCR and real time PCR, respectively. The qualitative PCR sensitivity in comparison to the serologic test (ELISA) was 87,5% (IC 95%: 70,1 – 95,9%) and the specificity 100% (IC 95%: 85,9 – 100,0%). The real time PCR sensitivity and specificity in comparison to the serologic test (ELISA) was 100% (IC 95%: 86,7 – 100,0%) e 96,67% (IC 95%: 80,9 – 99,8%) respectively. The seropositive individuals proviral load ranged from 13 to 343820 copies/10⁶ PBMC cells. Our study also observed that individuals with TSP/HAM had higher proviral load than those asymptomatic ones. The use of real time PCR in the clinical routine tests of the infected individuals will have a relevant role in the identification of the virus type and the determination of the proviral load, allowing an adequate treatment.

Key words: Human T-cell lymphotropic vírus, HTLV-I infections, molecular diagnosis, Polimerase Chain Reaction.

Introdução

Os testes para HTLV-I/II na triagem sorológica dos hemocentros foram introduzidos primeiramente no Japão em 1986, nos Estados Unidos em 1988, e no Brasil apenas em 1993, com o intuito de impedir a transmissão transfusional desses agentes virais em procedimentos hemoterápicos que empregam hemocomponentes celulares. Dessa maneira, tem-se identificado parcela significativa de portadores assintomáticos desses retrovírus em nosso meio (SEGURADO, 2001). Os índices de infecção entre doadores têm oscilado entre 0,4/1000 doações em Santa Catarina, 7,5/1000 doações em Pernambuco e 10/1000 doações no Maranhão (maior índice registrado) (CATALAN-SOARES *et al.* 2005), bastante superiores aos índices encontrados no Canadá, onde a positividade entre doadores é de 0,48/100000 pessoas-ano (CHIAVETTA *et al.* 2003).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I e HTLV-II pode ser requisitado em diferentes situações clínicas (SEGURADO, 2001): i) frente a um paciente que apresenta sintomas e/ou sinais sugestivos de doenças causadas por esses retrovírus, para confirmação da hipótese diagnóstica clínica; ii) na triagem diagnóstica de indivíduos expostos ao HTLV-I ou HTLV-II, como por exemplo, em comunicantes familiares ou parceiros sexuais de portadores dessas infecções; iii) na triagem compulsória de doadores assintomáticos de sangue ou órgãos.

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-I/II é feito habitualmente com testes sorológicos baseados na pesquisa de anticorpos contra antígenos dos vírus presentes no soro do indivíduo infectado. Vários testes para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV estão disponíveis no mercado, e incluem: i) teste de aglutinação de partículas de látex ou gelatina; ii) ELISA-Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay; iii) RIPA-Radioimunoprecipitação; iv) IFI-Imunofluorescência Indireta e v) Western Blot. Os dois últimos são usados como testes confirmatórios.

Devido à grande homologia entre os dois tipos de HTLV a detecção de anticorpos anti-HTLV-I/II pelas provas sorológicas convencionais, embora caracterize a infecção viral, não permite que se estabeleça o diagnóstico

diferencial entre ambos os agentes. Os testes sorológicos discriminatórios baseiam-se na pesquisa de anticorpos circulantes voltados a epitopos não compartilhados, que sejam específicos a um tipo de HTLV. Dessa maneira, são utilizados ensaios imunoenzimáticos que utilizam peptídeos sintéticos tipo-específicos como antígenos (LAL *et al.* 1991), ou ainda Western blot modificados, que incorporam antígenos recombinantes tipo-específicos aos lisados virais totais (HADLOCK *et al.* 1992). No entanto, é importante ressaltar que em alguns casos, mesmo os testes sorológicos discriminatórios não são capazes de identificar o tipo de HTLV responsável pela infecção, dificultando assim o correto aconselhamento do indivíduo (SEGURADO, 2001; SANTOS *et al.* 2003).

Além disso, recentemente foram descobertos mais dois tipos de HTLV: o HTLV-3 e o HTLV-4, que ao serem analisados através de testes sorológicos confirmatórios utilizados atualmente, demonstraram resultados indeterminados ou falso-positivo HTLV-I ou falso-positivo HTLV-II (CALATTINI *et al.* 2005; SWITZER *et al.* 2006)

Os testes moleculares empregados para o diagnóstico dos vírus HTLV-I/II baseiam-se na pesquisa de seqüências genômicas provirais em células mononucleares periféricas (PBMC) lisadas. Diferentemente de outros retrovírus, a carga viral circulante no sangue de indivíduos infectados por HTLV é muito pequena. Portanto, a sua detecção por métodos moleculares é realizada usando-se o DNA como ácido nucléico alvo.

Têm-se buscado amplificar as regiões mais conservadas do genoma viral (*pol* ou *tax*) utilizando *primers* consensuais, capazes de amplificar tanto as seqüências de HTLV-I como HTLV-II. A carga proviral de HTLV em indivíduos infectados pode ser determinada através da utilização da PCR em tempo real, uma técnica mais rápida e com menor risco de contaminação que a PCR simples ou *nested* PCR, pois a amplificação e a quantificação podem ser realizadas em um único tubo fechado (MACKAY *et al.* 2002). Além disso, permite a visualização da detecção durante a amplificação, e vem sendo empregada para determinação da carga viral do vírus HTLV devido à sua rapidez, precisão e acurácia.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho da PCR em tempo real no diagnóstico do HTLV-1, visando sua utilização na rotina laboratorial do HEMOPE.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo – A população de estudo foi caracterizada por uma amostragem não probabilística de conveniência, no período de novembro/2006 a abril/2007. A mesma foi composta por indivíduos com sorologia reagente (n=33) para anticorpos anti-HTLV, atendidos no ambulatório da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), bem como doadores de sangue (n=30) da mesma Instituição.

Após exame clínico-laboratorial padronizado, dos indivíduos com sorologia reagente no ELISA, teste de rotina utilizado na triagem, foram selecionados para a realização da PCR qualitativa. Como controle dessa abordagem, utilizamos os doadores que apresentaram resultados não reagentes.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM e HEMOPE entro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ). Os pacientes foram avaliados pelo médico responsável pela Unidade de Hematologia do Hospital HEMOPE, com apoio de consultores em Psicologia, Genética Médica e Serviço Social. Aqueles que apresentaram resultados positivos para HTLV foram encaminhados para tratamento.

Obtenção e contagem de células PBMC - O sangue, coletado em tubo contendo EDTA, foi primeiramente centrifugado a 300 x g por 7 minutos e o plasma desprezado. O sangue restante foi diluído com PBS (salina tamponada com fosfato) 0,01 M, pH 7,2, em igual proporção (1:1). Em tudo Falcon de 15 mL foram colocados 2 mL de Ficoll (Amersham Pharmacia) e 5 ml do sangue diluído em PBS depositado lentamente sobre o Ficoll. O tubo foi centrifugado por 30 minutos a 800 x g e em seguida o anel leucocitário formado, coletado e transferido para

outro tubo de 15 mL onde foi lavado mais duas vezes com PBS, sendo submetido à centrifugação por 5 minutos a 300 x g entre as lavagens. O *pellet* formado foi ressuspensão com 1 a 3 mL de PBS. Essa suspensão foi colocada em câmara de Newbauer para a contagem das células. Alíquotas contendo 10^6 células foram separadas, centrifugadas e o *pellet* armazenado a -20°C .

Extração do DNA a partir de células PBMC – A extração de DNA foi realizada pelo kit “Purification and Extration DNA GFX Column” (Amersham Pharmacia), seguindo as instruções do fabricante.

Nested PCR qualitativa – O DNA foi submetido à PCR qualitativa realizada em 2 etapas de amplificação.

Para o HTLV-I, na primeira amplificação, os seguintes *primers* foram utilizados: SK110-pol: 5' - CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G - 3' e SK44-tax: 5' - GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG - 3'. Na segunda amplificação foram utilizados: SK248-env: 5' - CTA GTC GAC GCT CCA GGA TAT GAC C - 3' e SK249-enc: 5' - CAG ACC GCC ACC GGT ACC GCT CGG C - 3'.

A mistura de reação de amplificação para o HTLV-I, com volume final de 20 μl continha Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl_2 1,25 mM, 5 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de DNTP (concentração final de 200 μmol s para cada dnucléotídeo), 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 2 μl do DNA extraído do indivíduo. A primeira amplificação ocorreu em 7 minutos a 95°C , 35 ciclos de 1,5 minuto a 55°C , 2 minutos a 72°C e 1 minuto a 95°C , e por fim uma extensão de 10 minutos a 72°C . Já a segunda amplificação foi utilizada a mesma mistura de reação, trocando-se apenas os *primers* a serem usados e utilizou-se o amplicon da primeira amplificação diluído 1:100 seguindo-se uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C , 30 ciclos de 1 minuto a 58°C , 2 minutos a 72°C e 1 minuto a 94°C , seguido de uma extensão de 10 minutos a 72°C (LEE *et al.* 2004). O resultado final foi um produto de 466 pb.

Para o HTLV-II, na primeira amplificação, os seguintes *primers* foram utilizados: ET401-env/tax: 5' - CTC CTA TTC TGG GAA CAA GGG GGT TT - 3' SK44. Na segunda amplificação foram utilizados os *primers*: ET403 env/tax: 5' - GGC TGG GGA CTA AAC TGG GAT CCT GG - 3' e ET404 env/tax: 5' - CCA AAC ACG TAG ACG GGG GAT CC - 3'.

A mistura de reação de amplificação para o HTLV-II, também com volume final de 20 µl continha Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 3,0 mM, 5 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de DNTP (concentração final de 200 µmols para cada dnucleotídeo), 0,2 µl de DMSO, 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 2 µl do DNA extraído do indivíduo. A primeira e segunda amplificações seguiram a mesma ciclagem da primeira amplificação a amplificação do HTLV-I. A segunda amplificação foi utilizada a mesma mistura principal trocando-se apenas os *primers* e utilizando o amplicon da primeira amplificação diluído 1:100 de acordo com (LEE *et al.* 2004). O resultado final foi um produto de 821 pb.

PCR em tempo real

O plasmídeo para construção da curva padrão utilizada no experimento foi gentilmente cedida pelo LASP – Laboratório Avançado de Saúde Pública do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz na Bahia. Trata-se de um clone com dupla inserção contendo uma porção do íntron 12 do gene da albumina e a região *pol* do genoma do HTLV-I contida entre as posições 4708 e 4953 (DEHÉE *et al.* 2002).

Quantificação do HTLV-I nas amostras – Todas as amostras foram amplificadas em duplicata utilizando-se os seguintes *primers* (DEHÉE *et al.* 2002): SK 110: 5'- CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G -3' e SK 111: 5'- GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT - 3'.

Quantificação da albumina nas amostras – todas as amostras foram amplificadas em duplicata utilizando-se os seguintes *primers* (DEHÉE *et al.* 2002): Alb-S: 5'-

GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T – 3' e Alb-AS: 5'- AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T – 3'.

A mistura principal usada nas duas reações utilizou 2 µl do DNA, 10 µM de cada *primer* e SYBR® Green Master Mix, em um total de 25 µl de reação. Tanto o HTLV-I quanto a albumina, seguiram o seguinte protocolo de amplificação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 65°C e foram amplificados paralelamente no Rotor Gene 3000 (Uniscience) no Laboratório de Virologia do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami)/UFPE.

A quantificação da carga proviral de HTLV-I foi calculada como a razão entre (média do número de cópias de HTLV-I/média do número de cópias da albumina) x 2 x 10⁶ e expressos em número de cópias/ 10⁶ células PBMC (DEHÉE *et al.* 2002).

Análise dos dados

O limite de detecção do DNA utilizando a PCR em tempo real para a quantificação da carga proviral do HTLV-I foi analisada através de diluições seriadas (10⁵ a 10⁰). A sensibilidade e a especificidade da PCR em tempo real foram realizadas de acordo com Ferreira e Ávila (2001).

Resultados

Foram analisadas 63 amostras: 33 amostras apresentaram sorologia reagentes para HTLV e 30 amostras foram não reagentes para HTLV.

O grupo de indivíduos com sorologia reagentes era constituído de 27 mulheres com idade média de 47 anos, e 6 homens com idade média de 48 anos. O grupo de indivíduos com sorologia não reagentes era composto de 26 homens com idade média de 35 anos e 4 mulheres com idade média de 35 anos.

PCR Qualitativa para HTLV-I e II

Os resultados da análise da PCR qualitativa para HTLV (Figuras 1) estão demonstrados na Tabela 1. Todos os indivíduos com sorologia não reagente se mostraram também não reagentes na PCR qualitativa. Do grupo de indivíduos com sorologia reagente, 4 apresentaram resultados não reagente na PCR qualitativa. A sensibilidade da PCR qualitativa foi de 87,9% (IC 95%: 70,9 – 96,0%) e a especificidade foi de 100% (IC 95%: 85,9 – 100,0%)

Carga proviral de HTLV-I

Uma vez calculada a curva padrão, o software automaticamente fez a quantificação do número de DNA de HTLV-I ou de albumina, relacionando o C_t da amostra com o C_t da curva padrão (Figura 2 e 3). Dessa maneira, foi calculada a carga proviral de HTLV-I pela seguinte fórmula: (média do número de cópias de HTLV-I / média do número de cópias da albumina) $\times 2 \times 10^6$. Os resultados foram expressos em número de cópias/ 10^6 células PBMC.

A carga proviral dos indivíduos reagentes na sorologia (n=33) foi quantificada através da PCR em tempo real. A carga proviral variou entre 13 cópias/ 10^6 células PBMC e 343820 cópias/ 10^6 células PBMC. Dos 30 indivíduos que foram não reagentes na sorologia, um mostrou uma carga proviral de 308 cópias/ 10^6 . A sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real foram de 100% (IC 95%: 86,7 – 100,0%) e 96,67% (IC 95%: 80,9 – 99,8%), respectivamente.

Analisando os dados obtidos não houve diferença significativa entre o desempenho da PCR qualitativa e da PCR em tempo real.

Discussão

O diagnóstico laboratorial de triagem da infecção pelo HTLV é feito através de exames sorológicos, principalmente pelo método de ELISA, com confirmação através do método de “Western blot” para definição do tipo do vírus (I ou II).

Nos casos em que o “Western blot” for inconclusivo deve utilizar-se os métodos moleculares (BRASIL 2003, SWITZER *et al.* 2006, SANTOS *et al.* 2003) que se caracterizam, especialmente o PCR, pela elevada especificidade (GALLEGO *et al.* 2004).

A PCR em tempo real permite a detecção e quantificação de seqüências alvo pela medida contínua do acúmulo ou redução dos sinais de fluorescência durante a amplificação da reação. Ela é realizada em sistema fechado, diminuindo o risco de contaminação e eliminando a etapa de eletroforese em gel como na PCR comum (GUNSON *et al.* 2006). Durante a PCR em tempo real, mais precisamente durante o anelamento dos *primers* e a extensão da seqüência alvo, quantidades maiores de SYBR® Green ligam-se às fitas duplas de DNA sintetizadas, o que leva a um aumento de emissão de fluorescência. Quando o DNA é novamente desnaturado no ciclo da PCR, o SYBR Green desprende-se, diminuindo a emissão de fluorescência (WATZINGER *et al.* 2006).

Segundo Gunson *et al.* (2006) essa propriedade do SYBR® Green de ligar-se a fitas duplas tem vantagens e desvantagens. Ela permite que haja pequenos erros de pareamento de bases durante a extensão, porém, mesmo assim, é capaz de ligar-se e emitir fluorescência. Isso é de grande valia quando estudamos vírus, pois mesmo mutações ou mudanças em seqüências de regiões conservadas podem levar a erros de pareamento de sondas, ocasionando resultados falso-negativos. Com o SYBR® Green esta possibilidade ainda existe, mas é bastante reduzida se comparada a ensaios que utilizam sondas. Contudo, essa mesma propriedade de ligar-se a qualquer dupla fita diminui a especificidade da reação. Pode ocorrer emissão de fluorescência mesmo quando a amostra é negativa devido à ligação do SYBR® Green a dímeros de *primer* (GUNSON *et al.* 2006, WATZINGER *et al.* 2006). Para evitar erros de análise, utilizamos a curva de dissociação, a qual permite discriminar tamanhos de amplicons de dímeros de *primers*.

A utilização do SYBR® Green, no nosso estudo, foi baseada no fato de ser um ensaio de menor custo, e de não necessitar de uma sonda específica. Os

primers utilizados amplificam a região *pol* do vírus HTLV-I, por ser uma região conservada e já ser utilizada para a pesquisa de vírus em vários estudos (TOSSWILL *et al.* 1998, MONTANHEIRO *et al.* 2005, DEHÉE *et al.*, 2002).

A construção da curva padrão de HTLV-I foi realizada através de diluições seriadas do plasmídeo, que iam de 10^5 a 10^0 . Após a realização da PCR em tempo real com as diluições em triplicatas, observou-se um limite inferior de detecção de 10 cópias/reação, onde a diluição de 10^3 cópias teve um C_t de 22,59, confirmando resultados anteriores de Lee *et al.* 2004.

No grupo com sorologia não reagente para HTLV-1, nosso controle, todos os 30 indivíduos também se mostraram não reagente na PCR qualitativa. Entretanto, um deles obteve na PCR em tempo real uma carga proviral de 308 cópias/ 10^6 PBMC. Os testes da PCR qualitativa e da PCR em tempo real foram repetidos e os resultados foram reprodutíveis.

Os resultados da carga proviral dos indivíduos com sorologia reagente variou entre 13 a 343820 cópias/ 10^6 PBMC, resultados esses corroborados por outros estudos (LEE *et al.* 2004, NAGAI *et al.* 1998, MATSUZAKI *et al.* 2001).

Em consonância com outros (MONTANHEIRO *et al.* 2005, MATSUZAKI *et al.* 2001, NAGAI *et al.* 1998), nosso estudo também observou que os indivíduos com PET/MAH tiveram carga proviral mais elevada que a dos indivíduos assintomáticos.

Todavia, ainda não foi evidenciado cientificamente que exista uma relação inversa, ou seja, que os portadores de HTLV-I com alta carga proviral e sem doença clínica estabelecida estejam mais sujeitos a desenvolver as doenças associadas ao vírus. Para isto, conforme sugerido por Montanheiro *et al.* (2005) seria necessário um acompanhamento a longo prazo dos portadores assintomáticos.

Conclusões

Embora o presente estudo não tenha evidenciado diferença estatística entre esses dois métodos moleculares na identificação do HTLV I, verificou-se a ocorrência de resultados falso-negativos em pouco mais de 10% dos testes com

PCR qualitativa. Diante da reprodução dessa observação em amostragem mais ampla, a PCR em tempo real assumiria um papel relevante na identificação do vírus e na determinação simultânea da carga proviral.

Caso se estabeleça que os portadores de HTLV-I com carga proviral elevada sejam mais freqüentemente acometidos por leucemias e doenças neurológicas quando comparados àqueles com baixa carga viral, seremos levados a questionar a atual orientação de acompanhamento do Ministério da Saúde que estaria dando um tratamento uniforme aos desiguais entre si. Nessa eventualidade, dever-se-ia adotar, em relação a eles, uma estratégia de acompanhamento clínico diferenciada na expectativa de que um diagnóstico e uma terapêutica mais precoces das doenças clínicas possam resultar em melhor prognóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Secretaria em Vigilância da Saúde. Programa Nacional de DST Aids. *Guia de manejo clínico de HTLV*. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

CALATTINI, S. *et al.* Discovery of a new human T-cell lymphotropic vírus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*, London, v.2, n.1, p.30, 2005.

CATALAN-SOARES, B. *et al.* Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban áreas in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.21, n.3, p.926-931, 2005.

CHIAVETTA, J.Á. *et al.* Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990–2000. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, v.169, n.8, p.767-773, 2003.

DEHÉE, A. *et al.* Quantitation of HTLV-I proviral load by TaqMan real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.102, n.1-2, p.37-51, 2002.

GALLEGO, S. *et al.* Usefulness of a Nested-Polymerase Chain Reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic vírus type I/II. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.99, n.4, p.377-380, 2004.

GUNSON, R. N.; COLLINS, T. C.; CARMAN, W. F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.35, p.355-367, 2006.

HADLOCK, K.G. *et al.* Cloning and analysis of a recombinant antigen containing an epitope specific for human T cell lymphotropic virus type II. *Blood*, New York, v.79, n.10, p.2789-2796, 1992.

LAL, R. B. *et al.* Synthetic peptide-based immunoassays for distinguishing between human T-cell lymphotropic virus type I and II infections in seropositive individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.29, n.10, p.2253-2258, 1991.

LEE, T-H; CHAFETS, D. M.; BUSCH, M. P.; MURPHY, E. L. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Virology*, Amsterdam, v.31, p.275-282, 2004.

MACHAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in Virology. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.30, n.6, p.1292-1305, 2002.

MATSUZAKI, T. *et al.* HTLV-I proviral load correlates with progression disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *Journal of Neurovirology*, Philadelphia, v.7, p.228-234, 2001.

MONTANHEIRO, P. A. *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Sao Paulo, v.38, n.11, p.1643-1647, 2005.

NAGAI, M. *et al.* Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of Neurovirology*, Philadelphia, v.4, p.586-593, 1998.

SANTOS, T. J. T. *et al.* Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Salvador, v.7, n.2, p.202-209, 2003.

SEGURADO, A. A. C. Infecção por HTLV-I e HTLV-II. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro: 2ª. ed, Guanabara Koogan, p.103-110, 2001.

SWITZER, W. M. *et al.* Serologic testing for human T-lymphotropic virus-3 and -4. *Transfusion*, Philadelphia, v.46, n.9, p.1647-1648, 2006.

TOSSWILL, J. H. C. *et al.* Quantification of proviral DNA load in human T-cell leukaemia virus type I infections. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.75, p.21-26, 1998.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Molecular Aspects of Medicine*, Oxford, v.27, p.254-298, 2006.

Tabela 1 – Resultados da PCR Qualitativa para HTLV

PCR QUALITATIVA	SOROLOGIA REAGENTE PARA HTLV	
	Reagente	Não reagente
Positivo	29	0
Negativo	4	30



Figura 1 – Amostra representativa da PCR qualitativa para HTLV-I. Linha 1 – padrão de peso molecular de 100pb, linhas 2,3, 10 e 14 – amostras com resultados negativos. Linhas 4 a 9,11 a 13 – amostras com resultados positivos, linha 15 – controle positivo e linha 16 – controle negativo.

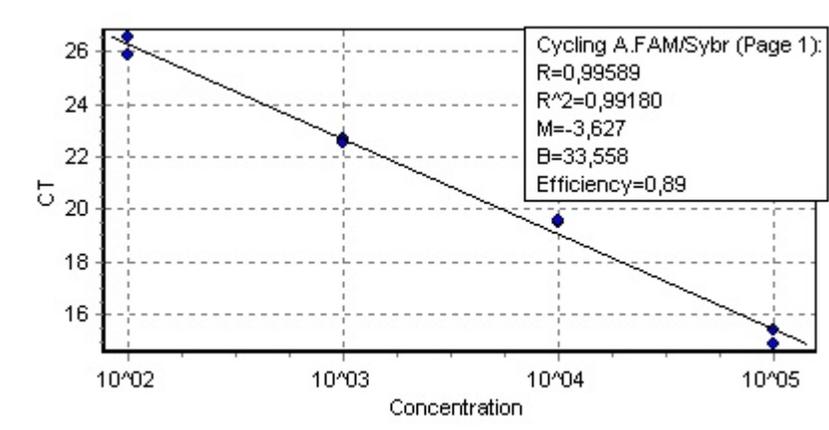


Figura 2 – Regressão linear da curva padrão de HTLV-I.

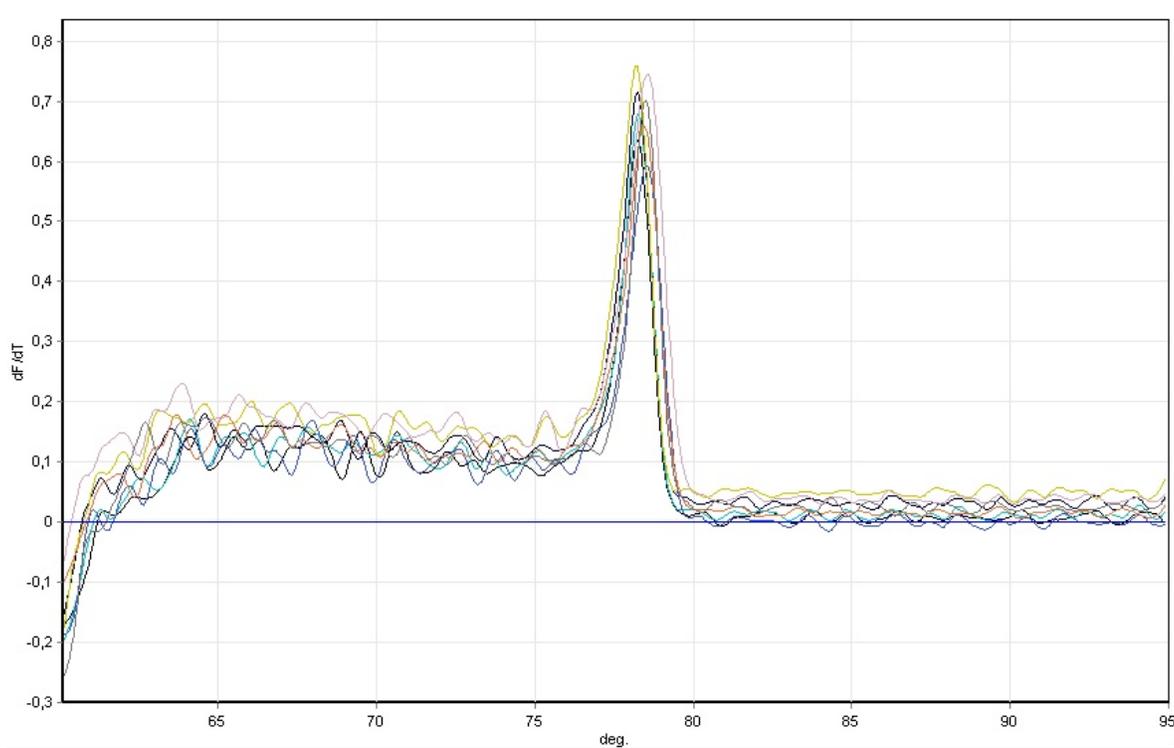


Figura 3 – Curva de dissociação dos padrões de HTLV-I.

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Resolução 196/96

Projeto: Avaliação da técnica de PCR em tempo real no diagnóstico da infecção pelo HTLV-I

Eu, _____, RG _____, aceito participar desse estudo, cujo objetivo é analisar o desempenho da técnica molecular, reação em cadeia por polimerase (PCR) em tempo real para a quantificação da carga viral dos indivíduos infectados pelo vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV-I), sob a responsabilidade da Dra. Bruna Cavalcanti Arruda. Fui informado que eu, como doador de sangue, terei meu sangue coletado para os testes de triagem sorológica, e o mesmo será utilizado no estudo acima referido. Fui orientado em relação aos benefícios desse estudo, que visa à padronização de uma técnica mais sensível para a quantificação viral de HTLV-I. Fui informado também que caso seja detectada a presença desse vírus no meu exame, serei encaminhado para tratamento. Fui informado ainda que o material coletado será utilizado no Biologia Molecular da Fundação HEMOPE apenas para os fins desta pesquisa e será posteriormente desprezado segundo as Boas Práticas de Laboratórios Clínicos e, portanto, não poderá ser utilizado em pesquisas posteriores. Fui informado que tenho liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem sofrer nenhum tipo de penalização ou pressão e que não serei ressarcido financeiramente para participar deste estudo.

Contato: Dra. Bruna Arruda Cavalcanti – CPqAM/FIOCRUZ – 9961-2431
Dra. Paula Loureiro – Fundação HEMOPE – Tel: 3421-6946

Recife, _____ de _____ de 2006.

Paciente ou responsável

Responsável pela pesquisa

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAMComitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Avaliação da técnica de PCR em tempo real no diagnóstico da infecção pelo HTLV-I".

Pesquisador responsável: Bruna Cavalcanti Arruda

Orientadora: Dr^a Yara de Miranda Gomes

DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CEP/CPqAM/FIOCRUZ), em 08 de novembro de 2006, recebeu cópia do projeto supra citado, da folha de rosto e do parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemope (CEP Hemope), datado de 02 de outubro de 2006, sob registro nº 023/06-A.

De acordo com o parecer, o projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação. Ressaltamos que em caso de mudança na metodologia far-se-á necessária a reavaliação do projeto em questão. Destacamos, ainda, que faz-se necessário o envio de relatórios parcial e final da pesquisa, conforme norma expressa no capítulo IX, artigo 2c da Resolução 196/96.

Recife, 30 de novembro de 2006


Dr^a Zulma Maia de Medeiros
Biomédica
Vice-Coordenadora
CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Observação:**Anexos:**

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 30/11/2007.



ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HEMOPE**Comitê de Ética em Pesquisa****1 - DADOS SOBRE O PROJETO****PARECER FINAL Nº 023/06-A-**

Título do Projeto: Avaliação da Técnica de PCR em Tempo Real no Diagnóstico da Infecção pelo HTLV-I

Instituição Solicitante: Fundação Hemope

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação Hemope

Responsável: Bruna Cavalcanti Arruda

Identidade: 5028117- SSP / PE

CPF: 029.726.754-01

Endereço: R. Padre Roma, 652, Ap. 202 - CEP 52060-060 - Parnamirim – Recife - PE

Telefone: (81) 3441-4725 – 9961-2431

Finalidade: Mestrado em Saúde Pública

2 – PARECER DO CEP

O CEP - Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às pendências apontadas no Parecer nº 023/06 e, em cumprimento aos dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, considera **APROVADO** o protocolo de pesquisa supracitado.

3 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III. 1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. Item III.2.e).
- **Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.**

CEP Hemope, 02 de Outubro de 2006


Maria Emília dos Santos
Coordenadora