



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

YAGO CÔRTEZ PINHEIRO GOMES

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA
DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIADA POR ALÇA (LAMP) PARA A
CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO PELOS VÍRUS LINFOTRÓPICOS PARA
CÉLULAS T HUMANAS DOS TIPOS 1 E 2 (HTLV-1/2).**

RIO DE JANEIRO

2020

YAGO CÔRTES PINHEIRO GOMES

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA
DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIADA POR ALÇA (LAMP) PARA A
CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO PELOS VÍRUS LINFOTRÓPICOS PARA
CÉLULAS T HUMANAS DOS TIPOS 1 E 2 (HTLV-1/2).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doença Infecciosas para obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva

Coorientador: Dr. Otávio de Melo Espíndola

Rio de Janeiro

2020

Gomes, Yago Côrtes Pinheiro.

Determinação da acurácia do teste de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) para a confirmação de infecção pelos vírus linfotrópicos para células t humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1/2). / Yago Côrtes Pinheiro Gomes. - Rio de Janeiro, 2020.

95 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2020.

Orientador: Marcus Tullius Teixeira da Silva.

Co-orientador: Otávio de Melo Espíndola.

Bibliografia: f. 64-71

1. LAMP. 2. HTLV-1. 3. HTLV-2. 4. acurácia. 5. diagnóstico confirmatório.

YAGO CÔRTEZ PINHEIRO GOMES

**DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA
DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIADA POR ALÇA (LAMP) PARA A
CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO PELOS VÍRUS LINFOTRÓPICOS PARA
CÉLULAS T HUMANAS DOS TIPOS 1 E 2 (HTLV-1/2).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doença Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva

Coorientador: Dr. Otávio de Melo Espíndola

Aprovada em 19 / 02 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Dra. Raquel de Vanconcellos Carvalhaes Oliveira (Presidente)

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – FIOCRUZ

Dra. Raquel Brandini de Boni

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – FIOCRUZ

Dra. Yasmine Rangel Vieira

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – FIOCRUZ

Dra. Cintia Xavier de Mello (Suplente/Revisor)

Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a toda minha família. Meu avô Raimundo e meu tio Humberto, que sempre se mostraram preocupados com minha formação, e desde sempre prestam todo tipo de auxílio que necessito quando algo foge ao meu controle. Ao meu irmão Tales que, bem lá no fundo (risos), torce pelo meu sucesso, da mesma forma que desejo a ele as melhores conquistas que a vida possa lhe proporcionar. E, principalmente, aos meus pais, que tiveram sempre o máximo de empenho em me educar e nunca mediram esforços em fazer o impossível para me verem feliz e no caminho certo. Amo todos vocês.

Aos amigos que me foram presenteados há mais tempo do que sou capaz de lembrar: Batista, Guilherme, Lucca, Ricardo e Zé; e, igualmente, ao Bruno, Felipe, Leandro, Leonardo e Mauricio, que foram, aos poucos, incorporando o melhor elenco da Tijuca. Espero que, como dito por Machado de Assis, a amizade seja como um círculo, e, como um círculo, não tenha começo nem fim.

Ao meu orientador Marcus Tullius, que me acolheu como aluno da melhor maneira possível, sempre muito competente e solícito.

Ao meu coorientador, Otávio Espíndola. Sem palavras para poder agradecer o quão importante foi sua participação. Muito inteligente e paciente, sem sua presença não seria possível a confecção deste trabalho.

À Dra. Adele Caterino de Araújo do Instituto Adolfo Lutz (IAL), por embarcar nesta colaboração e fornecer as amostras usadas neste estudo, além de ser sempre solícita e empenhar-se na aprovação do projeto na Câmara Técnico-Científica do IAL e nos Comitês de Ética. E à sua aluna de Doutorado, Karoline Rodrigues, por esclarecer dúvidas sobre as amostras.

Ao corpo docente do INI e a todos os profissionais que trabalham na Coordenação da Pós-Graduação. Um agradecimento especial à Priscilla, sempre dedicada e compreensiva, que tornou minha passagem pelo Mestrado Acadêmico mais tranquila.

Aos amigos que conheci na loucura do Mestrado, Amanda, Bruna e Lucas, que não seria a mesma coisa sem a presença de vocês. Tenho certeza de que o sucesso virá para todos.

A todos do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções, especialmente à Ana Cláudia, Beatriz, Isaac, Bruna, e Nicole, que fazem os meus dias muito mais leves e alegres. É sempre um prazer ir ao laboratório e trabalhar ao lado de vocês.

Por fim, à CAPES, que financiou os meus estudos e possibilitou a execução deste estudo e a apresentação dos resultados em eventos científicos.

RESUMO

O grupo de vírus linfotrópicos para células T humanas (HTLV) apresenta quatro integrantes: HTLV-1, 2, 3 e 4. Contudo, somente HTLV-1 e 2 apresentam relevância epidemiológica, com prevalência média de 0,46% em doadores de sangue no Brasil. Conforme o Ministério da Saúde, o diagnóstico de HTLV-1/2 é realizado por triagem com ELISA, seguida de confirmação pelos testes de *Western blot* (WB), imunoenensaio em linha (INNO-LIA) ou reação em cadeia da polimerase (PCR). O teste de INNO-LIA possui uma alta sensibilidade, resolvendo até 98% dos casos, embora tenha um alto custo, enquanto o WB pode apresentar resultados indeterminados em 30-60% dos casos. Em contrapartida à sensibilidade inferior, a PCR possui alta especificidade em comparação a estes métodos. Em virtude disso, os testes de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) para HTLV-1/2 estabelecidos por nosso grupo poderiam ser incorporados à rotina diagnóstica como alternativa à PCR com análise de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) ou à PCR em tempo real (qPCR). Portanto, este estudo teve como objetivo otimizar os testes de LAMP e determinar sua acurácia, sensibilidade e concordância frente aos resultados dos testes confirmatórios sorológicos (WB e INNO-LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) com amostras de indivíduos monoinfectados por HTLV-1 e 2 (n=144) ou coinfectados por HIV (n=92). Devido ao baixo desempenho de LAMP para HTLV-1 inicialmente, foram desenhados novos iniciadores e ajustadas as concentrações de betaína e magnésio. Após, este teste foi realizado na população coinfectada e mostrou uma acurácia de 90,24% em comparação com a qPCR, de 88,89% com a PCR-RFLP, e de 86,59% com o WB e INNO-LIA. Em relação ao resultado do diagnóstico definitivo, o teste de LAMP para HTLV-1 apresentou sensibilidade de 79,49%, resultando em valores similares à qPCR e à PCR-RFLP, que apresentaram taxas de 74,39% e 81,58%, respectivamente. LAMP para HTLV-2 obteve acurácia de 92,69% na comparação com a qPCR, de 96,30% com a PCR-RFLP, de 82,93% com o WB, e de 81,71% com o INNO-LIA. Na comparação com o diagnóstico final, LAMP para HTLV-2 obteve sensibilidade de 51,43%, contra 62,86% na qPCR e 54,29% na PCR-RFLP. De acordo com os critérios do índice *Kappa* de Cohen, o teste de LAMP para HTLV-1 teve concordância considerada substancial com todas as demais técnicas, enquanto para HTLV-2 foi quase perfeita na comparação com a PCR-RFLP, substancial com a qPCR, e moderada com as técnicas sorológicas. As taxas de acurácia dos testes de LAMP em pacientes monoinfectados por HTLV-1/2 foram de 89,26%, 89,58% e 87,50% nas comparações com o WB, a qPCR e a PCR-RFLP, respectivamente. Em relação ao diagnóstico final destas amostras, o teste de LAMP mostrou maior sensibilidade para HTLV-1 (92,00%) e HTLV-2 (68,42%) na comparação com a qPCR (86,40% e 36,84%, respectivamente). De modo geral, os testes de LAMP para HTLV-1 e 2 tiveram performance semelhante às outras técnicas moleculares. Por isso, estas técnicas representam uma alternativa vantajosa no diagnóstico destas infecções, pois possuem custo reduzido, necessitam de estrutura laboratorial simples e apresentam menor tempo de execução.

Palavras-chave: LAMP; HTLV-1; HTLV-2; acurácia; diagnóstico confirmatório; PCR.

ABSTRACT

The group of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) has four members: HTLV-1, 2, 3 and 4. However, only HTLV-1 and 2 have epidemiological relevance, with a mean prevalence of 0.46% in blood donors in Brazil. As Brazilian Ministry of Health recommends, the diagnosis of HTLV-1/2 is performed by screening with ELISA, followed by confirmation with Western blot (WB), in-line immunoassay (INNO-LIA) or polymerase chain reaction (PCR). The INNO-LIA has high sensitivity and is capable to solve almost 98% of the cases, although it is expensive. In turn, WB test can present indeterminate results in 30-60% of the cases. Although PCR displays lower sensibility, its specificity is higher than those assays. Therefore, the loop-mediated isothermal nucleic acid amplification (LAMP) tests for HTLV-1/2 established by our research group could be used in the laboratorial diagnostic routine as an alternative to PCR with restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) or real-time PCR (qPCR). Thus, the aim of this project was to optimize the LAMP test for HTLV-1/2 and to determine the accuracy, sensitivity and agreement score (Cohen's *Kappa*) of LAMP against serological (WB and INNO-LIA) and molecular (PCR-RFLP and qPCR) assays. For this, we used DNA samples from HTLV-1 and 2 monoinfected (n=144) or coinfecting with HIV (n=92). Due to a low performance of LAMP for HTLV-1, a new set of primers was designed and the reaction conditions were adjusted. DNA samples from HIV-coinfecting HTLV-1/2 carriers were tested again by the LAMP test for HTLV-1, which showed an accuracy of 90.24% compared to the qPCR, 88.89% against the PCR-RFLP, 86.59% compared with WB INNO-LIA. Based on the definitive diagnostic results, HTLV-1 LAMP test showed a sensitivity of 79.49%, which were similar to the rates of 74.39% and 81.58% respectively observed for qPCR and PCR-RFLP. LAMP for HTLV-2 had an accuracy of 92.69% in comparison to qPCR, 96.30% with PCR-RFLP, 82.93% against WB and 81.71% compared with INNO-LIA. In the analysis against the definitive diagnostic, LAMP test for HTLV-2 presented a sensitivity of 51.43% against, while the qPCR and the PCR-RFLP showed rates of 62.86% and 54.29%, respectively. The agreement score between the HTLV-1 LAMP test and the other techniques (WB, INNO-LIA, qPCR and PCR-RFLP) was considered strong, while the analysis of the LAMP test for HTLV-2 showed an agreement almost perfect in the comparison with the PCR-RFLP, strong with the qPCR and moderate compared to serological tests. The accuracy rates of the LAMP tests in samples from HTLV-1/2 monoinfected patients were 89.26%, 89.58% and 87.50% in the comparisons with WB, qPCR and PCR-RFLP, respectively. Considering the definitive diagnostic of these patients, LAMP test showed higher sensitivity for HTLV-1 (92.00%) and HTLV-2 (68.42%) compared to the qPCR (86.40% and 36.84%, respectively). In general, LAMP tests for HTLV-1/2 showed similar results to the others molecular techniques in both studied populations. Therefore, LAMP for HTLV-1/2 may represent an advantageous alternative for the diagnosis, since it has lower cost, requires a less complex laboratory structure and presents a shorter runtime.

Keywords: LAMP; HTLV-1; HTLV-2; accuracy; confirmatory diagnostic; PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição global da infecção por HTLV-1.....	11
Figura 2 – Distribuição das infecções por HTLV-1/2 no Brasil.	12
Figura 3 – Representação da organização genômica de HTLV-1, 2, 3, e 4.....	13
Figura 4 – Árvore filogenética da região LTR de HTLV-1.....	15
Figura 5 – Análise filogenética da região LTR de HTLV-2.....	16
Figura 6 – Representação do algoritmo de diagnóstico para as infecções de HTLV-1/2.....	19
Figura 7 – Representação do desenho de iniciadores para a técnica de LAMP.....	20
Figura 8 – Amplificação de DNA pela técnica de LAMP.	22
Figura 9 – Iniciadores de alça na técnica de LAMP.....	23
Figura 10 – Fluxograma de testagem realizado pelo IAL.....	27
Figura 11 – Avaliação da concentração de magnésio na reação de LAMP para HTLV-1.....	36
Figura 12 – Avaliação da concentração de betaína na reação de LAMP para HTLV-1.	37
Figura 13 – Comparação entre DNA polimerases <i>Bst</i> 2.0 WarmStart e Large Fragment.....	37
Figura 14 – Novos iniciadores do teste de LAMP desenhados para o gene <i>tax</i> de HTLV-1. .	43
Figura 15 – Padronização da concentração de betaína na reação de LAMP para HTLV-1. ...	44
Figura 16 – Padronização da concentração de magnésio na reação de LAMP para HTLV-1.	44
Figura Suplementar 1 – Polimorfismos nas regiões de <i>tax</i> de HTV-1 correspondentes aos iniciadores de LAMP previamente descritos.....	80
Figura Suplementar 2 – Polimorfismos nas regiões de <i>tax</i> de HTLV-1 correspondentes aos iniciadores de LAMP desenhados neste estudo.....	81
Figura Suplementar 3 – Polimorfismos nas regiões de <i>tax</i> de HTLV-2 correspondentes aos iniciadores de LAMP previamente descritos.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores de LAMP para HTLV-1/2 previamente descritos.	31
Tabela 3 – Acurácia dos testes de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2.	40
Tabela 4 – Índice de concordância entre o teste de LAMP e outros métodos de diagnóstico.	41
Tabela 5 – Carga proviral relativa de HTLV-1/2 conforme resultados do teste de LAMP.	42
Tabela 6 – Novos iniciadores de LAMP para HTLV-1.	43
Tabela 7 – Acurácia do teste de LAMP com novos iniciadores para HTLV-1.	46
Tabela 8 – Índice de concordância (<i>Kappa</i>) do teste de LAMP para HTLV-1.	47
Tabela 9 – Acurácia e sensibilidade do teste de LAMP em amostras de pacientes do IAL coinfectados.	49
Tabela 10 – Acurácia do teste de LAMP nas amostras do INI.	50
Tabela 11 – Índice de concordância (<i>Kappa</i>) do teste de LAMP com amostras do INI.	50
Tabela 12 – Sensibilidade dos testes de WB, qPCR, PCR-RFLP e LAMP em amostras de pacientes do INI.	52
Tabela 13 – Custo de algoritmos para o diagnóstico confirmatório de HTLV-1/2.	53
Tabela Suplementar 1 – Resultados de testes confirmatórios com amostras do IAL.	72
Tabela suplementar 2 – Acurácia e sensibilidade de testes realizados pelo IAL.	74
Tabela Suplementar 3 – Acurácia e sensibilidade de WB e INNO-LIA (IAL).	75
Tabela suplementar 4 – Acurácia e sensibilidade da qPCR e PCR-RFLP (IAL).	76
Tabela Suplementar 5 – Resultados de testes confirmatórios (INI/FIOCRUZ).	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Epidemiologia e transmissão do HTLV	10
1.2. Estrutura viral	12
1.3. Análise filogenética de HTLV	13
1.4. Diagnóstico laboratorial das infecções por HTLV-1/2	17
1.5. Teste de LAMP para detecção de HTLV-1/2	19
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO GERAL	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. METODOLOGIA	27
5.1. Desenho do estudo e casuística	27
5.2. Critérios de inclusão e exclusão de participantes, e coleta de dados	28
5.3. Aspectos éticos	28
5.4. Extração de DNA a partir de sangue periférico	29
5.5. Testes de LAMP para a detecção de HTLV-1/2	30
5.5.1. Iniciadores para LAMP	30
5.5.2. Otimização da técnica de LAMP para a amplificação de <i>tax</i> de HTLV-1 ..	31
5.5.3. Condições da reação de LAMP	32
5.6. Quantificação da carga proviral (CPV) de HTLV-1/2	33
5.7. PCR-RFLP para detecção de HTLV-1/2	34
5.8. Plano de análise	34
6. RESULTADOS	36
6.1. Otimização do teste de LAMP para a detecção molecular de HTLV-1	36
6.2. Teste de LAMP para HTLV-1 e 2 em amostras do IAL	38
6.3. Desenho e padronização de novos iniciadores de LAMP para HTLV-1	42
6.4. Teste de LAMP com novos iniciadores para HTLV-1 em amostras do IAL	45
6.5. Teste de LAMP em amostras de indivíduos mono infectados por HTLV-1 e 2 ..	49
6.6. Custo de algoritmos para o diagnóstico confirmatório de HTLV-1/2	53
7. DISCUSSÃO	54
8. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES	72
ANEXOS	83

1. INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos para células T humanas (HTLV) são atualmente classificados na ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *deltaretrovirus* (“International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)”, 2018), e foram os primeiros retrovírus descritos em humanos, sendo identificados com a descoberta de HTLV-1, em 1980, e de HTLV-2, em 1982 (GALLO, 2005). Em 2005, foram descritos os subtipos HTLV-3 e 4 a partir de amostras de sangue de caçadores de gorilas nas selvas do Camarões, África Central (MAHIEUX; GESSAIN, 2011).

Estudos epidemiológicos, filogenéticos e de evolução viral sugerem que o início da infecção pelo HTLV, em geral, ocorreu após frequentes transmissões do vírus linfotrópico para células T símias (STLV) entre primatas humanos e não-humanos no continente africano (LIU et al., 1996). No entanto, em contrapartida aos subtipos 3 e 4, que não apresentam relevância epidemiológica em regiões fora da África, HTLV-1 e 2 possuem uma distribuição global, se concentrando em regiões endêmicas na África, Oriente Médio, Ásia e Américas (GESSAIN; CASSAR, 2012; MAHIEUX; GESSAIN, 2011; MAUCLÈRE et al., 2011). Na América do Sul, sua provável disseminação ocorreu por meio das migrações de populações humanas pré-históricas vindas da Ásia pelo Estreito de Bering, há cerca de 11.000 a 13.000 anos (PAIVA et al., 2015). Após, se estabeleceu de forma endêmica na população brasileira, principalmente no Norte e Nordeste do país (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

A infecção por HTLV-1 está associada ao desenvolvimento da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), assim como outros sintomas neurológicos e inflamatórios (ARAUJO; SILVA, 2006). Por outro lado, a infecção por HTLV-2 raramente é patogênica, havendo poucos relatos de quadros atenuados de HAM/TSP (HJELLE et al., 1992; MURPHY et al., 1997), enquanto as infecções por HTLV-3 e 4 ainda não foram associadas ao desenvolvimento de doenças. Contudo, a maioria dos portadores de HTLV-1/2 permanece assintomática ao longo da vida, e 0,5 a 5% dos indivíduos infectados por HTLV-1 desenvolvem doenças (ARAUJO; SILVA, 2006). Além disso, uma vez que estes vírus compartilham vias de transmissão semelhantes a de HIV e HCV, a presença de coinfeções não é incomum (BEILKE, 2012; SILVA et al., 2016).

A estratégia de diagnóstico da infecção por estes vírus ainda é motivo de discordância entre diferentes autores, pois ainda não há uma técnica que seja considerada de referência para sua identificação (CASSAR; GESSAIN, 2017; COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAUJO,

2011; THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002). Por este motivo, diferentes guias, como o do Ministério da Saúde do Brasil (2003), sugerem algoritmos a serem utilizados no diagnóstico de HTLV-1/2, com um conjunto de métodos para a triagem e confirmação.

Dentre os métodos utilizados no diagnóstico, estão as técnicas moleculares, compostas pela PCR e suas variantes, que determinam a presença de sequências provirais em leucócitos de sangue periférico (BECHERER et al., 2018; COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAÚJO, 2011; SILVA et al., 2007; WATERS et al., 2011). Recentemente, nosso grupo de pesquisa estabeleceu um teste de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) para a detecção destes vírus (GOMES, YAGO, 2017), com base na metodologia descrita por NOTOMI et al. (2000), que é uma técnica molecular com especificidade teoricamente superior à da PCR, de execução mais prática e com custo reduzido. Desta forma, para a avaliação deste método, este trabalho teve como objetivo determinar a acurácia e a sensibilidade de LAMP no diagnóstico confirmatório de HTLV-1/2 utilizando amostras do Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, e do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Rio de Janeiro.

1.1. Epidemiologia e transmissão do HTLV

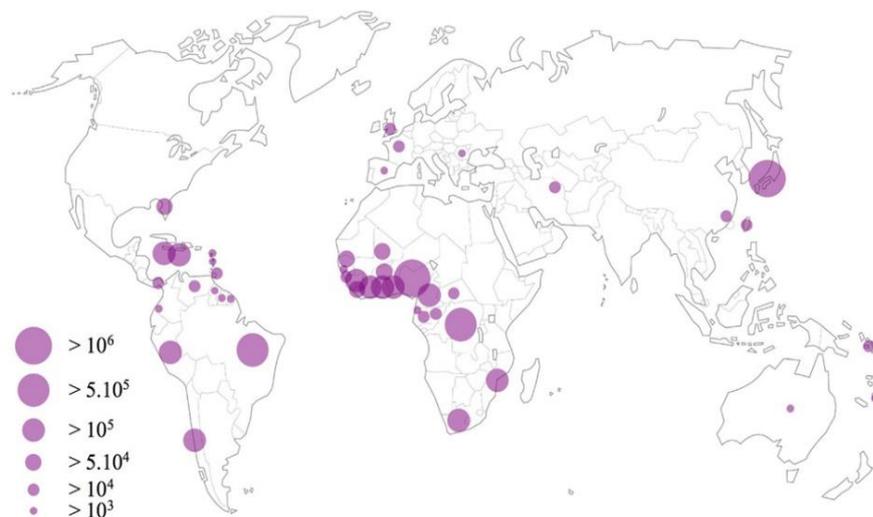
A transmissão de HTLV ocorre principalmente por três vias: (1) vertical, com destaque para o aleitamento materno, enquanto a transmissão transplacentária e durante o parto são raras; (2) por contato sexual; e (3) parenteral, por transfusão de sangue e componentes sanguíneos ou por compartilhamento de agulhas (PAIVA; CASSEB, 2014). Esta infecção apresenta prevalência mais elevada entre usuários de drogas endovenosas (UDEV) em comparação com doadores de sangue (CATERINO-DE-ARAÚJO et al., 1998; KHABBAZ et al., 1992), sendo HTLV-1 mais frequente entre UDEV no Brasil e Nova York (Estados Unidos), enquanto HTLV-2 é mais prevalente entre UDEV na Europa e centros urbanos da América do Norte (CATERINO-DE-ARAÚJO et al., 2015; PAIVA; CASSEB, 2014).

Diferente de outras infecções virais, em que se observa a síntese e liberação de vírions, na infecção por HTLV a viremia é indetectável, sendo que a transmissão entre células ocorre principalmente por uma estrutura denominada sinapse virológica, que apresenta semelhanças com a sinapse imunológica (GRAKOUÏ et al., 2015). Nesta última, linfócitos T ativados na interação com células apresentando antígenos polarizam seu centro organizador dos microtúbulos (MTOC) em direção à região de contato, promovendo uma reestruturação celular. Esta resposta facilita a transferência de moléculas e sinais entre as células, ocorrendo após o

receptor de células T reconhecer o antígeno apresentado (JENKINS et al., 2009). Por sua vez, na sinapse virológica, a polarização do MTOC ocorre no sentido contrário, da célula infectada para a célula-alvo, sendo acompanhada do acúmulo de proteínas e do genoma viral na região de junção entre as células, permitindo a transmissão da infecção (IGAKURA, 2003).

A distribuição dos casos de infecção por HTLV-1 não ocorre de modo homogêneo no mundo, sendo observadas regiões endêmicas no Japão, Caribe, África, América do Sul, e Oriente Médio (HANAOKA; KUBO; SAITOH, 2012). Por sua vez, a infecção por HTLV-2 é frequentemente encontrada em tribos indígenas das Américas do Norte, Central e do Sul, e alguns grupos isolados na África (HALL et al., 1996). Na década de 1970, se observou a disseminação deste vírus entre UDEV dos Estados Unidos, Europa e Ásia, sendo atualmente frequentemente detectado em coinfeção com os vírus das hepatites B e C e com HIV (CATERINO-DE-ARAÚJO et al., 2015; SILVA et al., 2002; SILVA, 2009). No entanto, devido a diversos fatores, como a ausência de notificação de casos, não há atualmente números precisos de portadores de HTLV-1/2 no mundo (HLELA et al., 2009), e estima-se que 5 a 10 milhões de indivíduos estão infectados (GESSAIN; CASSAR, 2012) (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição global da infecção por HTLV-1.



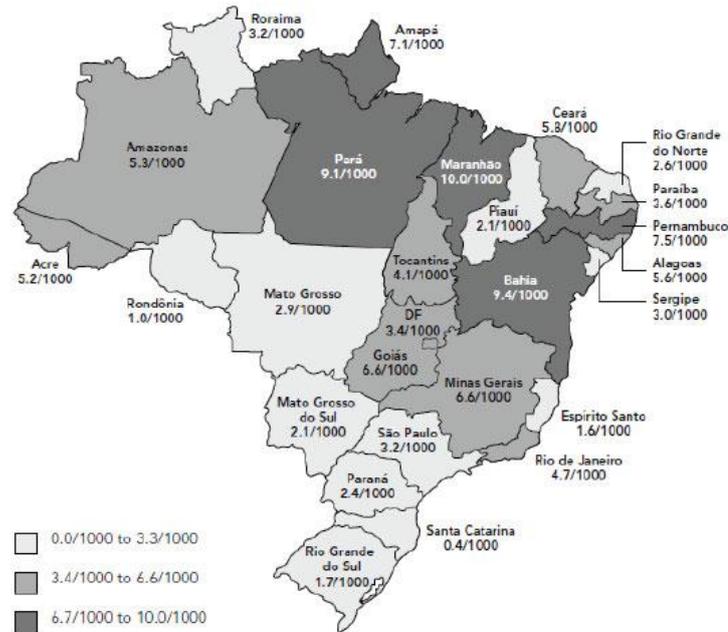
Legenda: Estimativa do número de portadores de infecção por HTLV-1 com base em aproximadamente 1,5 bilhão de indivíduos em áreas conhecidamente endêmicas, e através de dados epidemiológicos obtidos de estudos envolvendo gestantes, doadores de sangue e/ou diferentes populações de adultos. Em alguns países, áreas endêmicas para HTLV-1 estão limitadas a residentes de determinadas regiões, tais como Mashad, no Irã, Província de Fujian, na China, Tumaco, na Colômbia e Austrália Central.

Fonte: GESSAIN; CASSAR (2012).

No Brasil, estudos multicêntricos com base na triagem sorológica em hemocentros revelaram uma prevalência média de 0,46% de portadores da infecção por HTLV-1/2, sendo as maiores frequências encontradas em capitais de Estados das regiões Norte e Nordeste

(CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005) (Figura 2). Outro estudo de base populacional geral realizado em Salvador, Bahia, revelou uma prevalência de 1,76% na população desta cidade (DOURADO et al., 2003).

Figura 2 – Distribuição das infecções por HTLV-1/2 no Brasil.



Legenda: Prevalência das infecções por HTLV-1/2 (apresentada por 1000 doações) foi determinada através de triagem sorológica por ELISA em doadores de sangue em capitais de 26 Estados e Distrito Federal.

Fonte: CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI (2005).

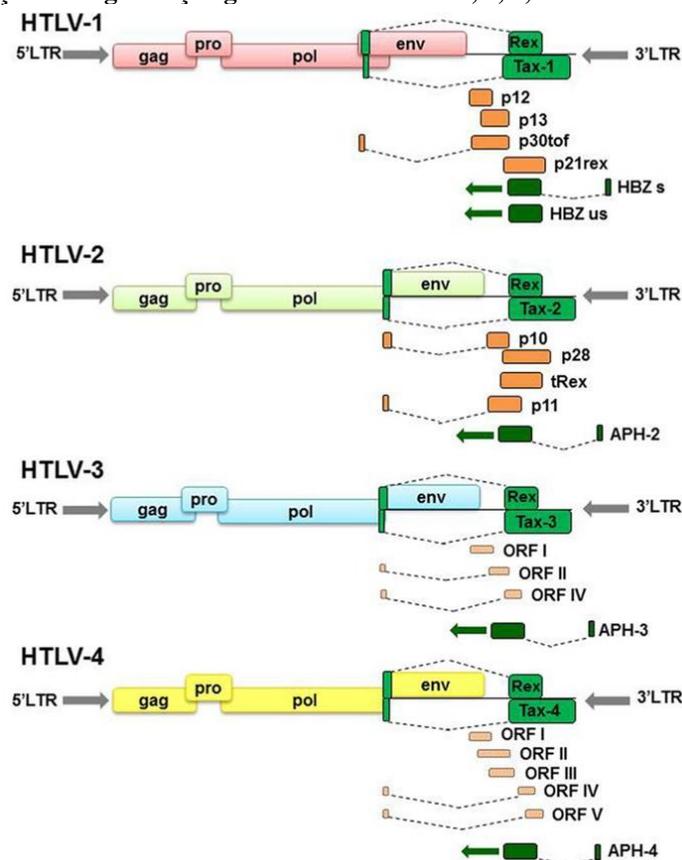
1.2. Estrutura viral

A partícula de HTLV é envelopada, contendo as glicoproteínas virais gp46 e gp21 e, eventualmente, proteínas de superfície celular, como por exemplo moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), e apresenta um nucleocapsídeo constituído pelas proteínas p15, p19 e p24. A estrutura de nucleocapsídeo contém um genoma diploide de RNA de fita simples, que está associado à protease (p10), à transcriptase reversa (p55) e à integrase (p32), que são enzimas de importância catalítica na replicação viral (COFFIN, 1996)

Como característica dos retrovírus, a molécula de RNA contida no vírion de HTLV é transcrita para DNA, por atividade da transcriptase reversa, após infecção celular. Em seguida, a estrutura resultante de DNA viral é integrada ao DNA celular pela proteína viral integrase. A partir deste momento, este material genético caracteriza-se como provírus, apresentando uma extensão aproximada de 9kb (SEIKI et al., 1983). Os provírus de HTLV-1/2/3/4 apresentam

regiões denominadas de repetições terminais longas (LTR, do inglês *long terminal repeats*), que contêm sequências promotoras e elementos de estímulo da transcrição. Além disso, estão presentes regiões que codificam para proteínas estruturais (genes *gag*, *env* e *pol*), e a região pX, que contém quatro janelas de leitura aberta (ORF-I, II, III, e IV, do inglês *open read frames*) (Figura 3), parcialmente sobrepostas, que codificam para as proteínas reguladoras Tax e Rex, que facilitam a transmissão viral e permitem o estabelecimento de infecção persistente (KANNIAN; GREEN, 2010), além de diferentes proteínas auxiliares, de acordo com o subtipo de HTLV (KANNIAN; GREEN, 2010; ROMANELLI et al., 2013).

Figura 3 – Representação da organização genômica de HTLV-1, 2, 3, e 4.



Legenda: Estruturas representam o DNA proviral, incluindo as LTR 5' e 3'. A identificação dos genes está destacada em caixas de texto, que constituem as regiões codificantes para suas respectivas proteínas. Em verde, estão destacadas as ORFs (*open reading frames*) que codificam para as proteínas reguladoras Tax e Rex. Estruturas laranjas indicam ORFs que codificam para proteínas auxiliares, enquanto regiões em laranja claro indicam supostas ORFs de HTLV-3 e 4, presumidas a partir de análises de suas sequências genômicas.

Fonte: ROMANELLI et al., 2013.

1.3. Análise filogenética de HTLV

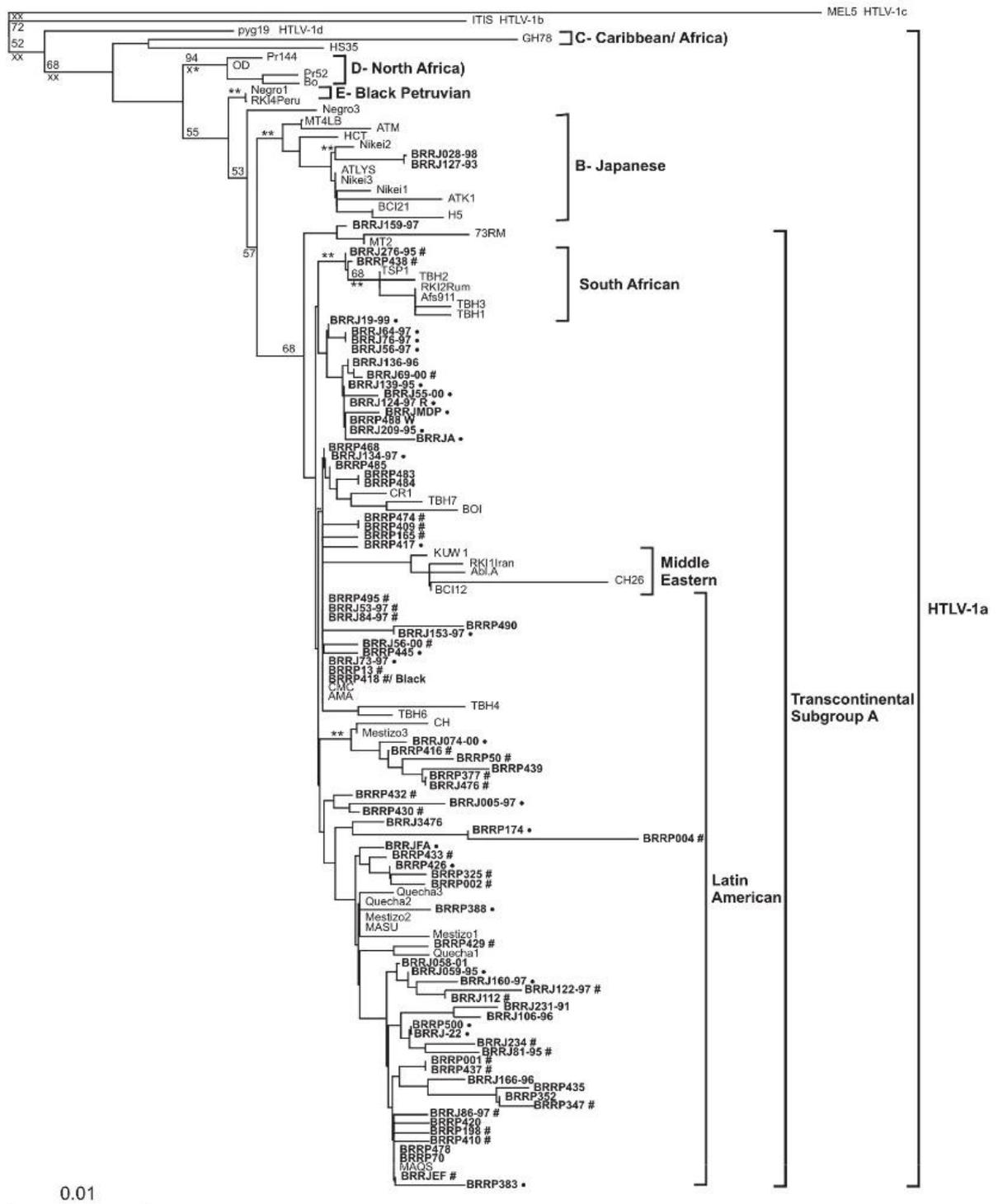
De modo geral, a análise filogenética de HTLV é realizada por comparação entre sequências derivadas de segmentos das regiões *env* ou LTR (EIRAKU et al., 1996; KASHIMA

et al., 2006; MAGRI et al., 2012; VANDAMME et al., 1998) por apresentarem alta variabilidade. De acordo com as sequências destas regiões, podem ser discriminados sete genótipos de HTLV-1: (1) 1a, ou Cosmopolita, que apresenta distribuição mundial; (2) 1b, da África Central; (3) 1c, da Melanésia (Nova Guiné e Austrália), que possui sequência altamente divergente; (4) 1d, isolado a partir de pigmeus da República Centro-Africana e de dois pacientes de Camarões e Gabão; (5) 1e, isolado de uma única amostra de pigmeu Efe na República Democrática do Congo; (6) 1f, detectado em um indivíduo no Gabão (KASHIMA et al., 2006); e 1g, descrito em caçadores da África Central (WOLFE et al., 2005).

O subtipo Cosmopolita (HTLV-1a) apresenta maior prevalência mundial (MIURA et al., 1994), sendo subdividido em cinco grupos: (1) A, Transcontinental; (2) B, Japonês; (3) C, Caribe/África; (4) D, Norte da África; e (5) E, Negros do Peru (KASHIMA et al., 2006) (Figura 4). O subgrupo Transcontinental (1aA) apresenta ainda outras denominações geográficas como: Latino Americano, Oriente Médio e Sul Africano (Figura 4). Em um estudo com amostras coletadas em Estados das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, foi observado o predomínio do genótipo Cosmopolita transcontinental (1aA), com 81,6% dos isolados pertencendo ao subgrupo Latino Americano, e todos os isolados de descendentes de japoneses (1,6%) caracterizados como Cosmopolita japonês (1aB) (KASHIMA et al., 2006).

Por sua vez, o HTLV-2 pode ser subdividido em quatro genótipos: (1) 2a, predominante entre UDEV dos Estados Unidos e Europa, e em ameríndios do México e Brasil; (2) 2b, referido como subtipo paleoíndio, sendo também encontrado em populações de UDEV dos Estados Unidos e Europa, e em tribos indígenas isoladas da Colômbia e Argentina, além de ser endêmico em regiões do continente africano (MAUCLÈRE et al., 2011); (3) 2c, classificado a partir de índios Caiapós, sendo praticamente restrito ao Brasil (EIRAKU et al., 1996); e (4) 2d, isolado de indivíduo pigmeu Efe do Congo (VANDAMME et al., 1998) (Figura 5). Em uma coorte de portadores de HTLV-2 do Rio de Janeiro, Brasil, foi observado predomínio do subtipo 2c (GOMES, YAGO, 2017).

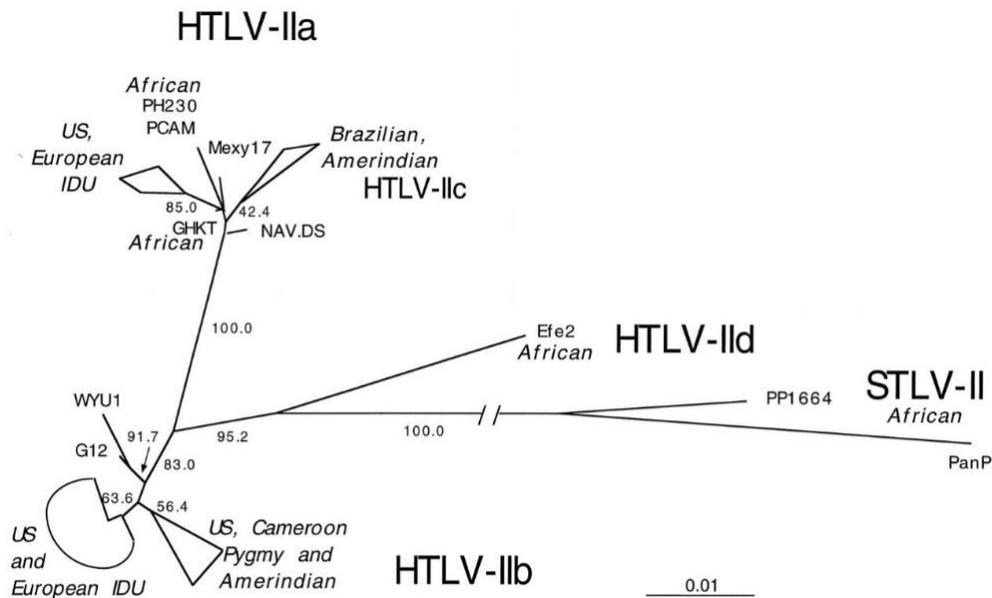
Figura 4 – Árvore filogenética da região LTR de HTLV-1.



Legenda: Árvore construída através do método *Neighbor-joining*. As sequências Pyg19 (HTLV-1d) e MEL5 (HTLV-1c) foram utilizadas como referências de comparação (*outgroup*). As chaves correspondentes aos diferentes genótipos estão identificadas, e isolados brasileiros foram destacados em negrito.

Fonte: KASHIMA et al. (2006).

Figura 5 – Análise filogenética da região LTR de HTLV-2.



Legenda: Árvore construída pelo método *Neighbor-joining* utilizando STLV-2 como referência de comparação.
Fonte: Adaptado de VANDAMME et al. (1998).

De acordo com FURUKAWA et al. (2000), a análise de variabilidade genética do gene *tax* de HTLV-1 permite a discriminação de dois subgrupos, *taxA* e *taxB*, sendo *taxA* pertencente ao subtipo Transcontinental (HTLV-1aA), enquanto *taxB* está associado ao subtipo Japonês (HTLV-1aB), conforme definido pela análise filogenética da região LTR. Corroborando dados anteriores, que demonstraram que o genótipo *taxA* de HTLV-1 é o mais prevalente no Brasil (KASHIMA et al, 2006), foi mostrado que este genótipo também é o predominante na coorte acompanhada no INI, Rio de Janeiro (GOMES, YAGO, 2017).

A proteína viral Tax (p40) apresenta múltiplas funções, sendo observada sua interação com diferentes fatores de transcrição, como por exemplo CREB/ATF, o fator de resposta ao soro (SRF), o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), e o fator nuclear κ B (NF- κ B). Assim, a proteína Tax é central no processo de desenvolvimento de doenças na infecção por HTLV-1, pois regula a expressão de genes virais e a função de diferentes genes celulares relacionados ao controle dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, de reorganização do citoesqueleto, adesão celular e de reparo do DNA (AZRAN; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY; ABOUD, 2004; BOXUS et al., 2008; CURIS et al., 2016; HLEIHEL et al., 2018; NEJMEDDINE et al., 2005; NEUVEUT; JEANG, 2000; SAGGIORO, 2011; WU et al., 2004).

1.4. Diagnóstico laboratorial das infecções por HTLV-1/2

Em todo o mundo, o diagnóstico das infecções por HTLV é realizado por triagem sorológica usando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) colorimétricos ou quimioluminescentes, ou testes de aglutinação de partículas. Seguidamente, são empregados testes confirmatórios sorológicos, tais como Western blot (WB), imunofluorescência, imunoensaio em linha (INNO-LIA) e/ou moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa ou em tempo real (qPCR). Contudo, não há definição de uma técnica de referência para o diagnóstico das infecções por HTLV-1/2, sendo utilizado um conjunto de métodos para triagem e confirmação (CASSAR; GESSAIN, 2017; THORSTENSSON; ALBERT; ANDERSSON, 2002).

O teste de WB afere a presença de anticorpos reativos para as proteínas do *core* viral (Gag) (p19, p24, p26, p28, p32, p36 e p53) e do envelope (Env) (gp46, rgp46-I, rgp46-II, GD21) (WHO, 1991). Uma vez que não é necessária a reatividade contra todas as proteínas, a base mínima necessária para definição de resultados positivos constitui reação com p19 e/ou p24, com GD21 e com o peptídeo recombinante de gp46 (rgp46-I e/ou rgp46-II) para a determinação de infecção por HTLV-1, HTLV-2, ou coinfeção. Por isso, resultados indeterminados, ou seja, com reatividade fora do padrão de positividade, não são incomuns. Em populações de alto risco, cerca de 50% dos resultados indeterminados por WB são positivos para HTLV-2, quando avaliados por PCR (MORIMOTO et al., 2007; NOVOA et al., 2007; OLAH et al., 2010). No entanto, apesar dos resultados indeterminados, o teste de WB ainda se mostra mais sensível que a PCR (COSTA et al., 2011). São relatadas diferentes causas para este fenômeno, como: reação cruzada com antígenos de *Plasmodium falciparum* em regiões endêmicas para ambas as infecções (MAHIEUX et al., 2000), infecção por HTLV-3 e 4 (CALATTINI et al., 2009) e longo período de soro-conversão (MARTINS et al., 2010). Ainda, resultados indeterminados no WB para HTLV-1 podem mostrar-se positivos na PCR. Estudos relatam que na realização de testes moleculares em desfechos indeterminados por WB, 12,5% dos casos foram positivos em doadores de sangue no Iran (ZANJANI et al., 2010), e 14,7% na Argentina (BERINI et al., 2006). Além disso, baixos níveis de carga proviral foram detectados em 42% de pacientes com sintomas neurológicos e 44% dos doadores de sangue nos Estados Unidos (YAO et al., 2006).

A razão da alta frequência de resultados indeterminados no WB para HTLV-1/2 ainda não foi completamente elucidada. Em estudo conduzido no Japão por KURAMITSU et al. (2017), foi realizada a análise filogenética e a quantificação da carga proviral em portadores de infecção por HTLV-1 com WB indeterminado, mostrando que esses indivíduos apresentavam

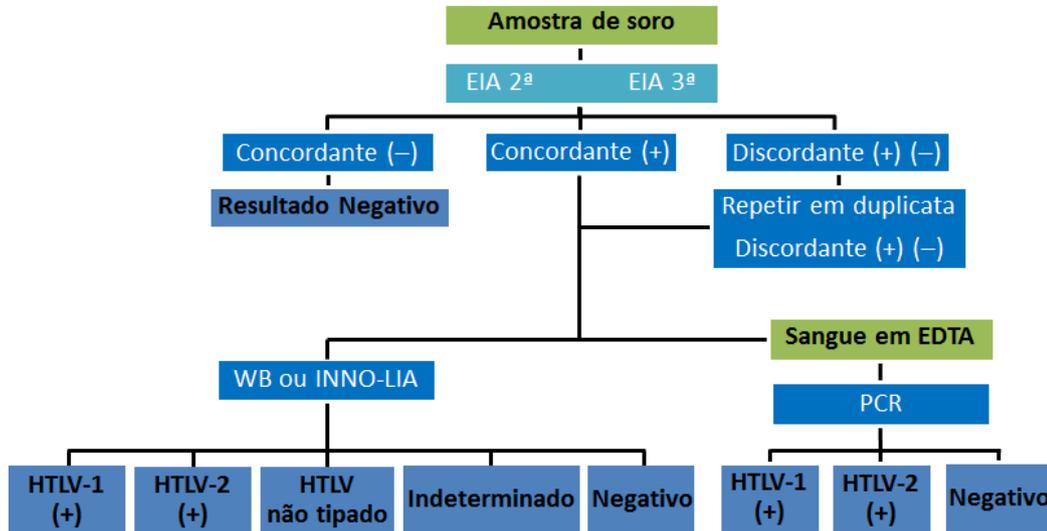
mediana de carga proviral 70 vezes inferior à de pacientes com WB positivo. Em relação à análise filogenética, as amostras foram caracterizadas como subtipo japonês (HTLV-1aB), embora não tenham formado um grupamento genético único. Curiosamente, foram observados códons de parada prematura nas regiões codificantes para a polimerase viral (Pol) e/ou proteínas Tax, Env, p12 e p30. Os autores sugeriram que tais mutações resultariam na diminuição de produção de antígenos virais, promovendo menor estimulação de respostas imunológicas do indivíduo e, por isso, interferindo nos resultados de WB. Dessa forma, tem sido sugerido que o diagnóstico sorológico seja complementado por técnicas moleculares.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (2003), o diagnóstico de infecções por HTLV-1/2 é realizado por triagem sorológica com o teste de ELISA. Resultados positivos e indeterminados necessitam de confirmação, e recomenda-se o uso de WB, imunofluorescência, ou de PCR (Figura 6). No entanto, não há disponível teste comercial de imunofluorescência, e o teste de WB para HTLV-1/2 mais comercializado no Brasil (HTLV Blot 2.4, Genelabs, Estados Unidos) ainda apresenta altos índices de resultados inconclusivos em regiões endêmicas. Esses resultados são compostos por padrões indeterminados, ou por tipagem viral indefinida, e na cidade de São Paulo, Brasil, foram observados em 35% casos, podendo alcançar taxas de até 65% dos indivíduos infectados em áreas intertropicais (FILIPPONE et al., 2012; JACOB et al., 2008). Outro teste confirmatório, o INNO-LIA (INNO-LIA Score HTLV-I/II, Fujirebio, Bélgica), embora apresente alta sensibilidade e especificidade (CAMPOS et al., 2017), é um teste caro e apresenta uso limitado no Brasil. Por isso, o diagnóstico confirmatório empregando técnicas moleculares tem se mostrado uma alternativa.

De acordo com o estudo de CAMPOS et al. (2017), a sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos utilizados no diagnóstico confirmatório das infecções por HTLV-1/2 variam consideravelmente entre ensaios sorológicos e moleculares, particularmente em populações coinfectadas com HIV. Tendo como referência o diagnóstico definitivo obtido com o conjunto dos testes empregados, os testes sorológicos de INNO-LIA e WB apresentaram sensibilidade de 97,2% e 82,4%, respectivamente, enquanto as técnicas moleculares, de qPCR e de PCR com análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), apresentaram taxas de 68,9% e 68,4%, respectivamente. Com relação à especificidade, foram observadas taxas mais elevadas dentre os métodos moleculares, que apresentaram valores de 100% e 79,6% para a qPCR e a PCR-RFLP, respectivamente. Por outro lado, o INNO-LIA e o WB apresentaram especificidade de 80% e 60%, respectivamente. Além disso, COSTA et al. (2011) também

demonstraram que a PCR é capaz de detectar o provírus de HTLV-1/2 em amostras de sangue de indivíduos com sorologia indeterminada.

Figura 6 – Representação do algoritmo de diagnóstico para as infecções de HTLV-1/2.



Legenda: Dois testes de ELISA são realizados como triagem sorológica, onde os resultados reagentes ou discordantes seguem para confirmação por Western blot (WB), imunoenensaio em linha (INNO-LIA) e/ou reação em cadeia da polimerase (PCR).

Dessa forma, estes autores sugerem que testes confirmatórios sorológicos e moleculares sejam usados de modo complementar, sendo os testes moleculares aplicados inicialmente, pois apresentam custo reduzido, e somente amostras negativas seriam submetidas aos testes WB ou INNO-LIA. Embora esta abordagem não descarte a utilização do WB e INNO-LIA, ela permite uma redução considerável no número de amostras a serem confirmadas por estas técnicas.

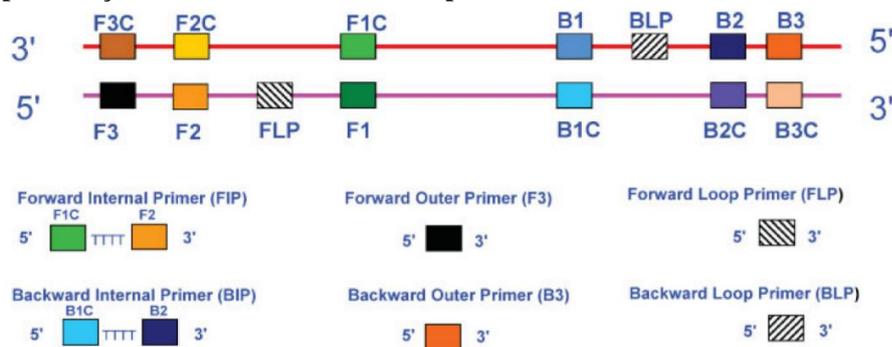
1.5. Teste de LAMP para detecção de HTLV-1/2

Diferente da PCR, a amplificação de DNA na metodologia de LAMP ocorre a partir de sucessivas etapas de reiniciação da síntese sempre que uma cadeia de fita simples é liberada após deslocamento decorrente da produção de uma nova dupla-fita. Esse fenômeno somente é possível com o uso de uma DNA polimerase com atividade de deslocamento, em conjunto com dois pares de iniciadores, um interno e outro externo, conferindo a capacidade da técnica de amplificar o material genético em temperatura constante. Por este motivo, a técnica de LAMP não requer estrutura laboratorial complexa, pois o teste pode ser executado em bloco aquecedor.

Os iniciadores utilizados em LAMP são especialmente desenhados para reconhecerem seis regiões distintas no DNA-alvo, o que confere alto nível de especificidade e reduz o risco de possíveis ampliações inespecíficas (NOTOMI et al., 2000). Além disso, esta técnica tolera um pequeno número de incompatibilidades entre a sequência dos iniciadores e do DNA-alvo, diferentemente da PCR, em que polimorfismos genéticos nas regiões de hibridização dos iniciadores podem reduzir a eficiência da reação. WANG et al. (2016) descreveram que na técnica de LAMP não se observa alteração do limite de detecção, mesmo na presença de 12 a 14 nucleotídeos discordantes nas regiões de hibridização dos iniciadores.

Os iniciadores internos são denominados FIP (do inglês *forward inner primer*) e BIP (do inglês *backward inner primer*), que contém duas sequências distintas correspondendo às sequências senso e anti-senso do DNA-alvo: uma para iniciação da reação (F2 ou B2) e outra para auto-iniciação das etapas seguintes (F1c ou B1c) (Figura 7). De modo geral, os segmentos internos à região a ser amplificada, denominadas F2 e B2, são delimitadas pelos iniciadores externos F3 e B3. São definidas F1c e B1c as regiões internas aos segmentos complementares à F2 e B2 (Figura 7). A junção das sequências referentes aos segmentos de F1c e F2, e de B1c e B2, dá origem aos iniciadores FIP e BIP, respectivamente (Figura 7) (NOTOMI et al., 2000; PARIDA et al., 2008).

Figura 7 – Representação do desenho de iniciadores para a técnica de LAMP.



Legenda: Apresentação da posição dos seis iniciadores: FIP/BIP, F3/B3 e FLP/BLP.

Fonte: PARIDA et al. (2008).

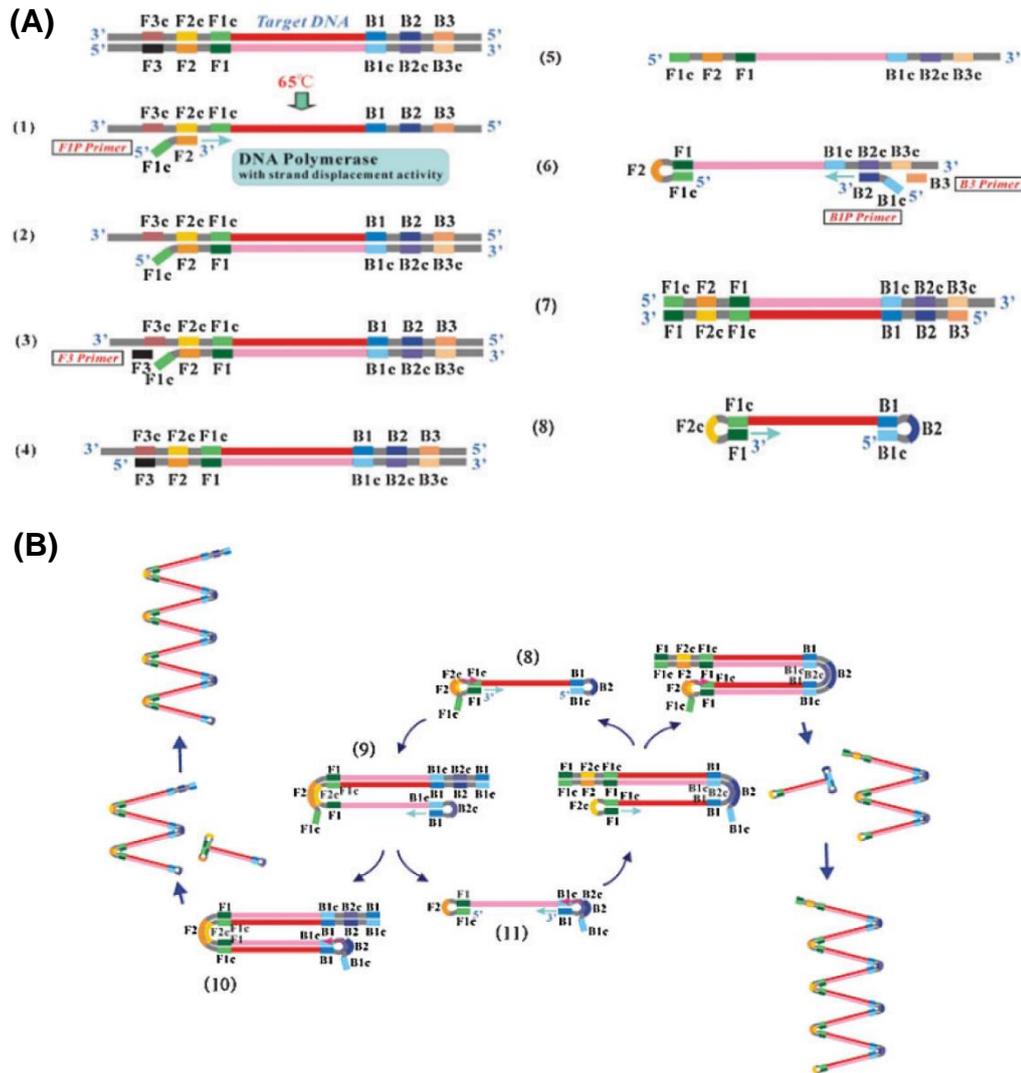
A amplificação de DNA pela técnica de LAMP ocorre em duas etapas: uma não-cíclica e outra cíclica. Na primeira, conforme ilustrado na Figura 8, existe a formação de uma estrutura de DNA com alças em ambas as extremidades, que serve de base para amplificação por LAMP. Quando a fita dupla de DNA atinge a condição de equilíbrio dinâmico à temperatura de 65°C, o iniciador FIP é capaz de anelar-se à sua sequência complementar no DNA-alvo através do

segmento F2 (Figura 8A, etapa 1), dando início a síntese de uma nova cadeia de DNA pela *Bst* DNA polimerase, que, através da sua atividade de deslocamento da dupla-fita, libera uma das fitas do DNA-alvo (Figura 8A, etapa 2). Posteriormente, a ligação do iniciador externo F3 à sua sequência complementar no DNA permite a extensão de uma nova fita (Figura 8A, etapa 3), formando uma fita dupla de DNA, e assim, deslocando e liberando a cadeia de DNA sintetizada a partir de FIP (Figura 8A, etapa 4).

Devido à complementariedade de F1c e F1 nesta fita simples de DNA, forma-se uma estrutura de alça em sua extremidade 5' (Figura 8A, etapa 5). Este DNA de fita simples, por sua vez, atua como molde para a extensão do terminal 3' de BIP (Figura 8A, etapa 6), sendo a dupla-fita resultante deslocada pela fita de DNA produzida a partir do iniciador externo B3 (Figura 8A, etapa 7). Através deste processo, a fita de DNA contendo BIP é liberada como uma fita simples e, devido à complementariedade das regiões B1c e B1, é formada uma estrutura de alça na extremidade 5' (Figura 8A, etapa 8). A hibridização entre F1c e F1 no terminal 3' desta fita dá origem a uma estrutura com alças em ambas as extremidades, semelhante a um halter (Figura 8A, etapa 8), que serve de base para a etapa de amplificação cíclica (PARIDA et al., 2008).

Após extensão do terminal 3' de F1 na extremidade 3' da estrutura em halter produzida na etapa não-cíclica, a etapa cíclica de LAMP tem início com a hibridização de FIP à região F2c da alça desta mesma estrutura (Figura 8B, etapa 8). Este evento dá início à síntese de uma nova fita de DNA, gerando uma molécula contendo a estrutura original em halter, que desloca a fita de DNA produzida anteriormente, que passa a ter uma estrutura de alça com haste duas vezes mais longa, contendo duas cópias da sequência-alvo (Figura 8B, etapa 9). Uma estrutura de alça é formada no terminal 3' livre desta fita devido à complementariedade das regiões B1c e B1. Com isso, a partir desta extremidade, a síntese de DNA ocorre a partir de sua própria estrutura como molde, liberando a cadeia complementar ligada a FIP (Figura 8B, etapa 9). A ligação do iniciador BIP à região B2c do DNA-alvo dá início à síntese de uma nova molécula de dupla-fita que, por sua vez, promove um novo deslocamento e libera uma das fitas de DNA (Figura 8B, etapa 10).

Figura 8 – Amplificação de DNA pela técnica de LAMP.



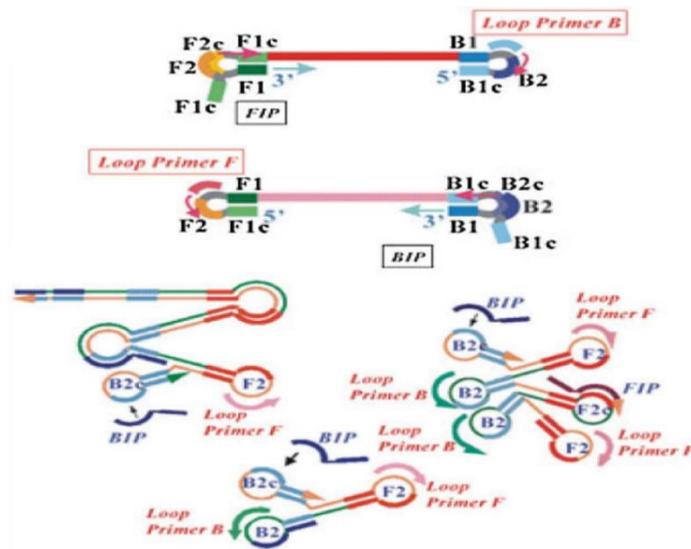
Legenda: (A) Fase não-cíclica de LAMP, descrita nas etapas de 1–8, em que é formada uma estrutura de DNA com alças em ambas extremidades. (B) Fase de amplificação cíclica de LAMP, apresentada nas etapas 9–11, que ocorre a partir da estrutura de DNA gerada na fase não-cíclica. (1) Hibridização do segmento F2 de FIP à sequência alvo do DNA. (2) Síntese de fita complementar de DNA pela *Bst* DNA polimerase por extensão de FIP. (3) Hibridização do iniciador externo F3. (4) Síntese da fita de DNA a partir de F3, e (5) deslocamento da fita complementar contendo FIP, (6) levando à formação de uma estrutura de alça em sua extremidade 5' devido à hibridização das regiões F1c e F1. A hibridização de BIP à esta molécula dá início a síntese de nova fita de DNA na extremidade 3', (7) que é subsequentemente deslocada pela fita sintetizada a partir de B3. (8) A fita simples de DNA gerada após deslocamento sofre hibridização entre as regiões F1c e F1 na extremidade 3' e de B1c e B1 na extremidade 5', formando uma estrutura em halter que serve como ponto de partida para a etapa de amplificação cíclica. (9) Amplificação exponencial da fita em forma de halter, empregando apenas os iniciadores internos, FIP e BIP. O produto da reação é constituído de estruturas de diferentes tamanhos, que consistem em repetições alternadamente invertidas na mesma cadeia, gerando estruturas ramificadas.

Fonte: PARIDA et al. (2008).

Além disso, a fita liberada na etapa anterior (etapa 9) dá origem a uma nova molécula de fita simples com estrutura em halter, reiniciando a amplificação da sequência-alvo de LAMP

(Figura 8B, etapa 11). Como resultado deste processo, são geradas moléculas de DNA de tamanhos distintos, contendo múltiplas cópias da sequência-alvo. Os produtos desta amplificação podem ser representados como moléculas de DNA constituídas por várias repetições alternadamente invertidas da estrutura de halter, e estruturas ramificadas com múltiplas alças (Figura 8B) (PARIDA et al., 2008). A amplificação de DNA pelo método de LAMP pode ser acelerada pela adição de dois iniciadores de alça (*loop*), denominados LF e LB, que são complementares às regiões de alça da fita simples de DNA em forma de halter. Estes iniciadores fornecem sítios adicionais de iniciação da síntese de DNA, acelerando assim a amplificação da sequência-alvo, e reduzindo o tempo de reação (Figura 9) (NAGAMINE; HASE; NOTOMI, 2002; PARIDA et al., 2008).

Figura 9 – Iniciadores de alça na técnica de LAMP.



Legenda: A reação de LAMP pode ser acelerada com o uso de iniciadores para as regiões de alça na estrutura de DNA formada durante a fase não-cíclica de LAMP, denominados LF e LB. Estes iniciadores, complementares às regiões de alça, possibilitam sítios adicionais de iniciação da síntese de DNA, acelerando a amplificação de DNA e reduzindo o tempo de reação.

Fonte: PARIDA et al. (2008).

2. JUSTIFICATIVA

Recentemente, nosso grupo de pesquisa estabeleceu testes de LAMP para a detecção de HTLV-1 e 2 que apresentaram sensibilidade superior à PCR. A técnica de LAMP apresenta vantagens em relação à PCR, tais como: (1) amplificação de DNA em condições isotérmicas, risco reduzido de amplificação inespecífica devido ao uso de três pares de iniciadores; (2) alta sensibilidade; (3) fácil execução, pois não requer estrutura laboratorial sofisticada, podendo ser realizada em banho-maria ou bloco aquecedor; e (4) produção massiva de amplicons, cujo resultado pode ser determinado visualmente com a adição de corantes de DNA.

Estas características fazem desta técnica uma opção valiosa como método molecular no algoritmo de diagnóstico das infecções por HTLV-1/2, principalmente se implementada antes dos métodos sorológicos. Por isso, a definição da acurácia dos testes de LAMP com amostras previamente caracterizadas por diferentes metodologias é necessária para a sua implementação na rotina diagnóstica.

3. OBJETIVO GERAL

Determinar a acurácia e sensibilidade do teste de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) na confirmação de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os testes de LAMP para HTLV-1/2 e comparar seu desempenho utilizando as enzimas *Bst 2.0 WarmStart* e *Bst Large Fragment* DNA polimerase.
- Determinar a acurácia e sensibilidade dos testes de LAMP para HTLV-1/2.
- Determinar a acurácia e sensibilidade dos testes de LAMP, tendo como referência somente os resultados de métodos moleculares (PCR-RFLP e qPCR).
- Determinar o nível de concordância dos testes de LAMP para HTLV-1/2 com os diferentes métodos de diagnóstico confirmatório.

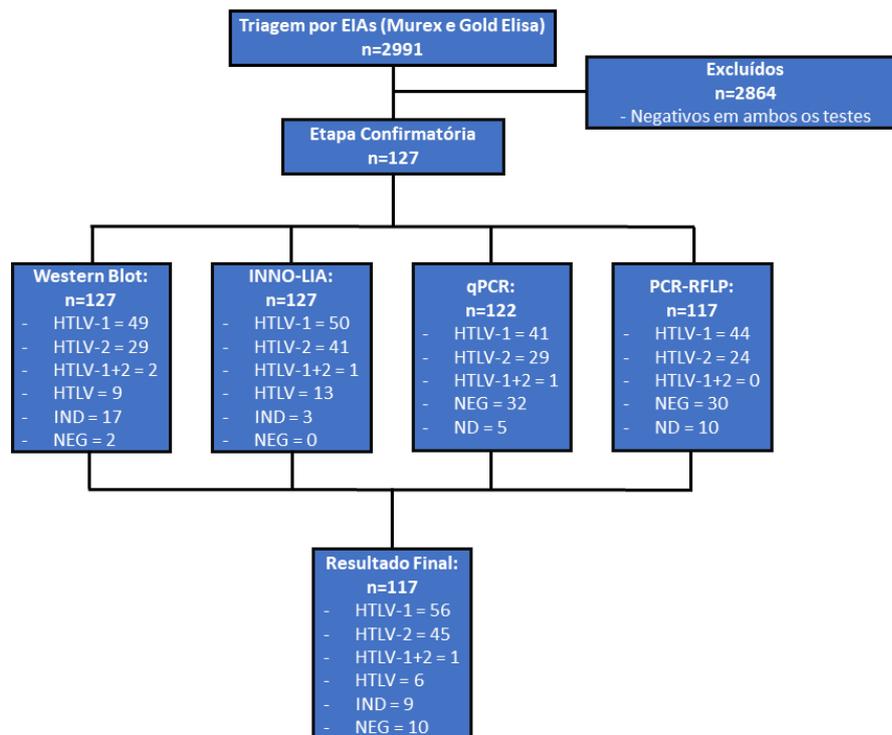
5. METODOLOGIA

5.1. Desenho do estudo e casuística

Estudo transversal para avaliação do método de LAMP, com uso de amostras de DNA proviral de HTLV-1 e 2, coletadas entre 2012 e 2015, de indivíduos diagnosticados em uma coorte de portadores de HIV, em estudo realizado no IAL, São Paulo (CAMPOS et al., 2017).

Amostras com resultado reagente ($OD/cut-off > 1,1$) ou indeterminado ($OD/cut-off$ entre 0,9 e 1,1), em pelo menos um de dois testes de ELISA (Murex e Gold ELISA) ($n=127$), foram submetidas à confirmação pelos testes sorológicos de WB e INNO-LIA, e testes moleculares de qPCR e PCR-RFLP (CAMPOS et al., 2017). Em 108 casos, foi confirmada infecção por HTLV-1 ($n=56$), por HTLV-2 ($n=45$), coinfeção por HTLV-1 e HTLV-2 ($n=1$), e por HTLV, porém sem definição do tipo viral ($n=6$). Nas 19 amostras restantes, nove tiveram padrão indeterminado pela análise com testes sorológicos e foram negativas nos testes moleculares, enquanto dez apresentaram resultado negativo em todos os testes confirmatórios (Figura 10).

Figura 10 – Fluxograma de testagem realizado pelo IAL.



Legenda: Portadores de HIV ($n=2991$) foram testados para HTLV-1/2 por ELISA (Murex e o Gold Elisa). Amostras positivas em pelo menos um dos testes seguiram para confirmação ($n=127$) com quatro testes (Western Blot, INNO-LIA, qPCR e PCR-RFLP), que compuseram o resultado final, podendo ser: positivo para HTLV-1 ou HTLV-2, coinfeção por HTLV-1 e HTLV-2 (HTLV-1+2), infecção por HTLV sem tipagem viral, indeterminado (IND) ou negativo (NEG). ND, não determinado.

Esses pacientes foram divididos em dois grupos: G1, constituído de indivíduos que se infectaram por via parenteral e tinham conhecimento do diagnóstico há um longo tempo, cuja grande maioria fazia o uso de terapia antirretroviral (TARV), e G2, composto por pacientes com diagnóstico recente de infecção por HIV, e que, portanto, ainda não faziam uso de TARV.

Além disso, foram selecionadas amostras de DNA de indivíduos com diagnóstico de infecção por HTLV-1 (n=125) e HTLV-2 (n=19), a partir de biorrepositório constituído durante o acompanhamento de coorte do INI pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções (LAPCLIN-NEURO), no período de 2014 a 2017. Essas amostras haviam sido submetidas à triagem por ELISA e posterior confirmação por WB (n=121) e/ou PCR (n=144). Parte destas amostras foi utilizada para otimização do teste de LAMP para HTLV-1 (n=31). Na comparação da performance dos diferentes testes, os ensaios de LAMP para HTLV-1 e 2 foram realizados em paralelo à PCR-RFLP e à qPCR, enquanto os resultados de WB foram recuperados de banco de dados do LAPCLIN-NEURO.

5.2. Critérios de inclusão e exclusão de participantes, e coleta de dados

Não foram recrutados novos participantes. No entanto, o único critério para seleção das amostras de DNA proviral proveniente do IAL foi a disponibilidade de volume suficiente para a realização das reações de LAMP (mínimo de 10µl). Por isso, foram utilizadas nesta pesquisa 92 amostras dos seguintes grupos: HTLV-1 (n=39), HTLV-2 (n=35), HTLV não tipado (n=3), sorologia indeterminada (n=5) e negativas (n=10), que foram identificadas somente por códigos numéricos (001 a 127).

Em relação aos portadores de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 provenientes do INI, foram incluídos indivíduos maiores de 18 anos, com diagnóstico inicial realizado por ELISA e confirmado por WB e/ou PCR, que continham amostra com volume suficiente para realização dos testes, e que assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do estudo original. Foram excluídos pacientes coinfectados por HIV, HBV e HCV.

5.3. Aspectos éticos

Amostras de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 utilizadas neste projeto derivam do estudo “Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população infectada pelo HIV-1 de São Paulo” aprovado pelo CTC-IAL (protocolo 106D/2012), e pelo Comitê de

Ética em Pesquisa (CEP) do IAL (CAAE 11302512.0.0000.0059). As amostras foram mantidas em freezer -20°C sob a guarda/responsabilidade da Dr^a Adele Caterino de Araújo, no Centro de Imunologia do IAL, São Paulo. O TCLE deste projeto original previa a comparação de vários testes sorológicos e moleculares para a confirmação do diagnóstico de infecção por HTLV-1 e 2, e os resultados prévios utilizados para comparação foram publicados por CAMPOS et al. (2017), sem a necessidade de identificação dos participantes da pesquisa, cujas amostras receberam apenas números de identificação de 001 a 127.

O projeto foi aprovado em 23 de julho de 2018 pelo Comitê Técnico Científico do IAL, em 07 de dezembro de 2018 pelo CEP do INI (CAAE 98332818.9.0000.5262), e em 11 de abril de 2019 pelo CEP do IAL (CAAE 98332818.9.3000.0059). O Termo de Transferência de Material (TTM) foi celebrado entre o INI e o IAL em 08 de agosto de 2019, por documento aprovado pelo Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT)-GESTEC/FIOCRUZ, pela Procuradoria da FIOCRUZ e pelo IAL.

Para o uso das amostras provenientes do INI, foi obtida aprovação e assinatura de TCLE no estudo “Diagnóstico confirmatório das infecções por HTLV-1/2 pela técnica de LAMP”, sob coordenação do Dr. Otávio de Melo Espíndola (LAPCLIN-NEURO), aprovado pelo CEP do INI em 17 de fevereiro de 2014 (CAAE: 23369813.7.0000.5262).

5.4. Extração de DNA a partir de sangue periférico

A extração de DNA de leucócitos de sangue periférico de pacientes do IAL foi realizada com o sistema robotizado da Roche (Extrator MagNA Pure LC 2.0) e o kit MagNA Pure LC DNA isolation kit I (Roche Diagnostics), conforme descrito por CAMPOS et al. (2017). Com relação às amostras do INI, a extração foi realizada com o kit Puregene Blood Core B (Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, 300 μL de sangue periférico em EDTA em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados de 900 μL de solução para lise de hemácias. Após homogeneização, o material foi incubado a temperatura ambiente por 1 minuto, ou até a lise de hemácias, sendo posteriormente centrifugado a $16.000 \times g$ por 20 segundos para sedimentação dos leucócitos. O sobrenadante foi descartado com uma micropipeta, sendo deixado um resíduo de aproximadamente 50 μL . Após a ressuspensão das células, foram adicionados 300 μL de solução de lise celular e, após homogeneização, as amostras foram mantidas por 1 minuto a temperatura ambiente. Subsequentemente, 100 μL de solução de precipitação de proteínas

foram adicionados nas amostras, que foram agitadas vigorosamente por 15 segundos, e centrifugadas a $16.000 \times g$ por 1 minuto para sedimentação do precipitado proteico. O sobrenadante resultante foi vertido para um microtubo de 1,5mL contendo 300 μ L de isopropanol (Merck) e, após homogeneização por inversão (50 vezes), o DNA precipitado foi sedimentado por centrifugação a $16.000 \times g$ por 1 minuto. Após descarte do sobrenadante, o DNA foi lavado duas vezes com 600 μ L de etanol a 75% por centrifugação a $16.000 \times g$ por 1 minuto. O sobrenadante da última lavagem foi completamente removido com o auxílio de uma micropipeta, e o DNA precipitado secado ao ar por 5 minutos, sendo homogeneizado em 100 μ L de solução de reidratação. A amostra obtida foi incubada durante a noite a temperatura ambiente para total dissolução do DNA, e estocada a -20°C até a sua utilização.

5.5. Testes de LAMP para a detecção de HTLV-1/2

5.5.1. Iniciadores para LAMP

Foram utilizados iniciadores previamente descritos para HTLV-1 e 2 (GOMES, YAGO, 2017) (Tabela 1). Enquanto o conjunto de iniciadores de HTLV-1 foi desenhado exatamente conforme a referência ATK (GenBank J02029, nucleotídeos 7386-7689), no de HTLV-2 foram considerados dois polimorfismos (A7819G e A7991G) presentes na referência Mo (GenBank M10060, nucleotídeos 7757-7992). Novos iniciadores foram desenhados para HTLV-1 neste estudo com o programa PrimerExplorer V5 (<https://primerexplorer.jp/e/>) utilizando a sequência parcial do gene *tax* da linhagem ATK (nucleotídeos 7874-8323) como referência. Esta região foi selecionada, pois, na análise com sequências de HTLV-1 (n=80) de pacientes da coorte do INI/FIOCRUZ (GenBank MF277043-MF277122), apresentava somente um polimorfismo genético. Foram utilizadas as seguintes condições: (i) Iniciadores com 15 a 25-mer; (ii) temperatura de dissociação (T_m) das regiões F1c/B1c de 64°C a 66°C ; (iii) T_m das regiões F2/B2 e F3/B3 de 59°C a 61°C ; (iv) conteúdo de GC entre 40% e 60%; (v) valor da mudança de energia livre (ΔG), para determinar a estabilidade dos iniciadores, menor que -3 kcal/mol para no terminal 5' e menor que -4 kcal/mol no terminal 3' dos iniciadores, e de $-2,5$ kcal/mol na verificação de dímeros; (vi) distância de 120 a 160-pb entre F2 e B2, alça (região entre F1c e F2) com 40 a 60-pb, distância de 0 a 60-pb entre F2 e F3 e de 0 a 100-pb entre F1c e B1c. A formação de dímeros foi conferida com a plataforma Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher), sendo descartados os conjuntos de iniciadores contendo qualquer possível ligação

estável ($\Delta G \geq -5$ kcal/mol) entre iniciadores na região 3'. A especificidade dos iniciadores para HTLV-1 foi avaliada *in silico* por alinhamento com a sequência da linhagem Mo de HTLV-2 (GenBank M10060) com o programa BioEdit v7.2.5. Conjuntos com pelo menos um iniciador com homologia >50% foram descartados. A análise da formação de *hairpin* foi feita com o programa OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), e foram descartados os conjuntos de iniciadores com temperatura de dissociação >50°C.

Tabela 1 – Iniciadores de LAMP para HTLV-1/2 previamente descritos.

LAMP	Iniciadores ^a	Sequências (5'→3') ^b	Posições ^c
HTLV-1	FIP-1	5'- gagtcgagggataaggaactgtctgtccagagcatcagatc -3'	(F1c: 7545-7524) (F2: 7464-7582)
	BIP-1	5'- cacccagagaacctctaagaccaaggagggtggaatgttg -3'	(B1c: 7557-7578) (B2: 7634-7617)
	F3-1	5'-ctgtgtacaaggcgactg-3'	7386-7403
	B3-1	5'-ggtgggttccatgtatcc-3'	7689-7672
	LF-1	5'-agagctgagccgataacg-3'	7523-7506
	LB-1	5'-ccgccaatcactcatacaac-3'	7594-7613
HTLV-2	FIP-2	5'- gatacagggagccctcagccacacaggggcagtc atag-3'	(F1c: 7887-7869) (F2: 7810-7828)
	BIP-2	5'- gcctggtgtacaggacttctcccgtcattgaagg tccat-3'	(F1c: 7824-7914) (F2: 7967-7950)
	F3-2	5'-tcaccaaggtgcctctaa-3'	7757-7774
	B3-2	5'-gcaagggccggaatcat-3'	7992-7975
	LF-2	5'-ggttggaacattgtgtgg-3'	7868-7850
	LB-2	5'-tccatcttaacaaccccagg-3'	7924-7943

Notas: Iniciadores descritos por GOMES, YAGO (2017). LAMP, amplificação isotérmica mediada por alça.

^a Iniciadores FIP e BIP são constituídos pelas junções das sequências F1c+F2 e B1c+B2, respectivamente.

^b As regiões F1c/B1c estão destacadas em negrito, e as regiões F2/B2 estão sublinhadas.

^c Posições referentes às sequências das linhagens ATK (Genbank J02029) e Mo (Genbank M10060) de HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente.

5.5.2. Otimização da técnica de LAMP para a amplificação de *tax* de HTLV-1

A comparação das enzimas *Bst Large Fragment* e *Bst 2.0 WarmStart* DNA polimerase (New England Biolabs) no teste de LAMP foi executada com os iniciadores descritos na Tabela 1, nas seguintes concentrações: 40 pmoles de iniciadores FIP e BIP, 5 pmoles dos iniciadores F3 e B3, e 20 pmoles dos iniciadores LF e LB (Invitrogen). As reações foram realizadas com tampão de reação 1×, 8U de enzima, 0,4 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs)

(Invitrogen) e 5 µL de amostra de DNA a 20 ng/µL (100 ng) em volume final de 25 µL. As amostras de DNA utilizadas (n=31) foram derivadas de pacientes da coorte do INI/FIOCRUZ que continham carga proviral baixa ou indetectável e que já haviam sido submetidas à técnica de LAMP com os iniciadores para HTLV-1 previamente descritos (Tabela 1). Os testes com a DNA polimerase *Bst Large Fragment* foram realizados com 6mM de MgSO₄ e 0,8 M de betaína (GOMES, YAGO, 2017), enquanto nos testes com a enzima *Bst 2.0 WarmStart* foram utilizadas concentrações de betaína variando de zero a 1,6 M (Sigma-Aldrich), e de sulfato de magnésio (MgSO₄) variando de 3 a 6 mM. Uma vez que o tampão de reação contém 2 mM de MgSO₄, foi realizada a adição de 1 a 4 mM de MgSO₄.

Para otimização das condições de reação com os iniciadores desenhados nesse estudo, foi utilizada a DNA polimerase *Bst Large Fragment* e concentrações de betaína variando de 0,8 a 1,2 M, e de MgSO₄ variando de 3 a 6 mM.

5.5.3. Condições da reação de LAMP

Os testes de LAMP foram realizados com a DNA polimerase *Bst Large Fragment*, em volume final de 25 µL, com tampão de reação 1×, 8U de enzima e 0,4 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (Invitrogen), 40 pmoles de iniciadores FIP e BIP, 5 pmoles dos iniciadores F3 e B3, e 20 pmoles dos iniciadores LF e LB (Invitrogen), 6 mM de sulfato de magnésio (MgSO₄). Betaína foi adicionada nas concentrações de 1,0 M e 0,8 M nas reações para HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente.

Após adição de 5 µL de DNA à 16,5 µL da mistura de reação contendo MgSO₄, betaína, dNTPs, iniciadores e água, foi realizada a pré-desnaturação do DNA no Termociclador modelo T-100 (Bio-Rad) por incubação a 95°C por 5 minutos, 65°C por 1 minuto e 22°C por 5 minutos, sendo os microtubos transferidos para banho de gelo. Em seguida, as reações foram adicionadas de 3,5 µl de mistura contendo tampão de reação e *Bst* DNA polimerase, e incubadas a 65°C por 1 hora. Posteriormente, a reação foi incubada a 80°C por 10 minutos para inativação da enzima.

Os resultados foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1× (Invitrogen), contendo GelRed™ 0,5× (Biotium), com aplicação de 2 µL do produto da reação acrescido de 8 µL de TBE 1× e 2 µL de corante BlueJuice™ 10× (Invitrogen). A corrida foi realizada a 100V por 1h, e os resultados revelados por transiluminação UV e fotografados em Sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia, Brasil). Como controles negativos, foram realizadas reações contendo apenas água ou 100 ng de DNA

humano comercial (Promega). Foram consideradas positivas as reações com padrão de amplificação característico de LAMP, ou seja, formação de rastro na raia pelo material genético amplificado, e consideradas negativas as amostras com ausência de amplificação.

5.6. Quantificação da carga proviral (CPV) de HTLV-1/2

A CPV de HTLV-1/2 foi determinada por qPCR utilizando o equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen). Inicialmente, amostras de DNA de sangue periférico do biorrepositório do LAPCLIN-NEURO/INI foram quantificadas em espectrofotômetro UV (BioPhotometer Eppendorf) e diluídas para 20 ng/ μ L. As reações foram realizadas em duplicata com o reagente Rotor-Gene Probe PCR kit (Qiagen) e 5 μ L de DNA diluído, num volume final de 25 μ L. Como referência, foi amplificado um segmento de 79-pb do gene da β -globina humana, utilizando 50 pmoles dos iniciadores β -glob-F (5'-GCAAGAAAGTGCTCGG TGC-3') e β -glob-R (5'-TCAC TCAGTGTGGCAAAGGTG-3') e 2,5 pmoles da sonda β -glob (5'-TAGTGATGGCCTGGCTC ACCTGGAC-3') marcada com 5'-FAM e 3'-TAMRA. Para detecção das células infectadas, foi realizada a amplificação de um segmento de 159-pb do gene *tax* de HTLV-1/2, utilizando 15 pmoles dos iniciadores SK43 (5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3') e SK44 (5'-GAGCCGA TAACGCGTCCATCG-3') e 5 pmoles da sonda SK45 (5'-ACGCCCTACTGGCCACCTGTC-3') marcada com 5'-FAM e 3'-TAMRA. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de amplificação: ativação/desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 47 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos e de hibridização/extensão a 60°C por 15 segundos, sendo a fluorescência detectada ao final de cada ciclo. Para determinar o número total de células em cada reação foi utilizada uma curva-padrão construída com diluições a 1:2 de amostra de DNA humano comercial (Promega), variando de 12,5 a 400 ng por reação. A curva-padrão para determinação do número de células infectadas foi construída com diluições a 1:2 de DNA da linhagem TARL-2, que apresenta uma cópia do provírus de HTLV-1 por célula, variando de 3,125 a 200 ng por reação. As curvas-padrão apresentaram $R^2 > 0,998$, e a CPV de HTLV-1/2 foi calculada como o percentual de células infectadas na população de leucócitos de sangue periférico, com a seguinte fórmula: $[(\text{cópias de } tax)/(\text{cópias de } \beta\text{-globina}/2)] \times 100$.

5.7. PCR-RFLP para detecção de HTLV-1/2

A PCR convencional para detecção dos provírus foi realizada com a enzima Platinum™ *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 15 pmoles dos iniciadores SK43 e SK44, que geram um amplicon de 159-pb. Como controle da qualidade da amostra de DNA, foi realizada a amplificação do gene da β -globina humana com 50 pmoles dos iniciadores β -glob-F e β -glob-R. As reações foram realizadas em volume final de 50 μ L contendo: 1 \times tampão de PCR, 2mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 1,25U de *Taq* DNA polimerase e 5 μ L de DNA sem diluição. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos. Posteriormente, 15 μ L dos produtos da PCR foram submetidos a eletroforese a 100V por 90 minutos em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1 \times contendo GelRed™ 0,5 \times . Amostras com amplificação do gene da β -globina humana e sem amplificação do alvo de HTLV-1/2 foram consideradas negativas.

O produto das reações positivas para HTLV (20 μ L) foi submetido à digestão com 20U de Taq1 α (New England Biolabs), conforme instruções do fabricante, em um volume final de 30 μ L, para análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). As reações foram incubadas a 65°C por 4 horas e o resultado revelado por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1 \times contendo GelRed™ 0,5 \times a 100V por 90 minutos. Nas amostras positivas para HTLV-1 são observados dois fragmentos (139-pb e 20-pb), nas amostras de HTLV-2 são observados três fragmentos (85-pb, 54-pb e 20-pb), e amostras positivas para ambos os vírus apresentam quatro fragmentos (139-pb, 85-pb, 54-pb e 20-pb).

5.8. Plano de análise

Tabelas 2 \times 2 foram construídas com os resultados dos testes, e foram utilizadas para cálculo das taxas de acurácia e sensibilidade com o programa *R* versão 3.6.8, e os intervalos de confiança 95% foram definidos pelo método de Clopper-Pearson. A concordância entre os testes foi calculada pelo índice *Kappa* de Cohen com o programa GraphPad Prism 5. Contudo, devido ao desenho do estudo, que resultou na ausência de resultados falso-positivos, não foi possível calcular as taxas de especificidade dos testes de LAMP para HTLV-1/2.

A partir dos resultados dos testes confirmatórios realizados no IAL foi, primeiramente, determinada a acurácia e sensibilidade dos testes sorológicos (WB e INNO-LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP), em conjunto ou individualmente, tendo como referência o diagnóstico definitivo obtido pelo padrão-ouro, representado pelo somatório de todas as metodologias. A análise comparativa dos testes de LAMP também foi realizada frente ao diagnóstico definitivo, ou em relação aos resultados do conjunto de métodos moleculares ou sorológicos, ou ainda em relação a cada método de diagnóstico, separadamente. Não foram incluídas nas análises as amostras com resultado negativo na triagem por ELISA.

Para analisar a influência da quantidade de DNA e do número de cópias dos provírus nos resultados de LAMP, foram utilizados os resultados de Ct (*Cycle threshold*) na qPCR para o gene *pol* de HTLV-1/2 e para o gene da albumina humana (*alb*), respectivamente, descritos no estudo de CAMPOS et al. (2017). Dessa forma, foi determinada a carga proviral relativa de HTLV-1/2 pelo método de delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), descrito por LIVAK; SCHMITTGEN (2001).

Nos cálculos de acurácia, sensibilidade e concordância, as amostras foram estratificadas, sendo analisados o total de amostras de HTLV-1 e 2, de HTLV-1 ou HTLV-2, separadamente, ou ainda discriminados por grupo com ou sem o uso de TARV (G1 e G2, respectivamente). No que diz respeito aos testes realizados no IAL (Tabela Suplementar 1), foram consideradas positivas as amostras identificadas como HTLV-1, HTLV-2 ou HTLV, e negativas as amostras com resultado negativo ou indeterminado, conforme descrito por CAMPOS et al. (2017).

A partir dos resultados dos testes confirmatórios realizados no INI, foram calculadas a acurácia, a sensibilidade e concordância dos ensaios de WB, qPCR, PCR-RFLP, e de LAMP no diagnóstico de infecções por HTLV-1 e 2, separadamente, tendo como referência o diagnóstico definitivo obtido com o padrão-ouro, representado pelo somatório das técnicas de WB e PCR-RFLP.

A concordância entre os diferentes métodos foi avaliado pelo coeficiente *Kappa* de Cohen, no qual seus valores são indicados em um índice: menor que zero, insignificante; entre zero e 0,20, mínima; entre 0,21 e 0,40, razoável; entre 0,41 e 0,60, moderada; entre 0,61 e 0,80, substancial; e entre 0,81 e 1, quase perfeita (LANDIS; KOCH, 1977).

Por fim, o cálculo do custo dos algoritmos de confirmação das infecções por HTLV-1/2 foi realizado levando-se em consideração os seguintes valores por teste: INNO-LIA, R\$ 161,00; WB, R\$ 125,00; qPCR, R\$ 18,79; PCR-RFLP, R\$ 19,45; LAMP revelado com SYBR Green I, R\$ 9,99. Os custos de cada teste foram definidos de acordo com os protocolos do LAPCLIN-NEURO e cotações de abril de 2020.

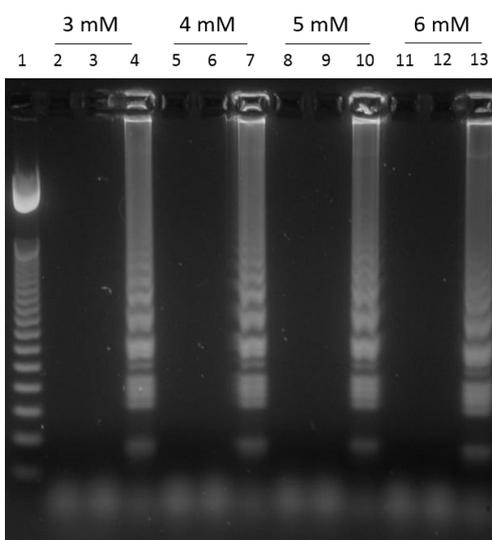
6. RESULTADOS

6.1. Otimização do teste de LAMP para a detecção molecular de HTLV-1

Inicialmente, foi avaliada a possibilidade de substituição da *Bst Large Fragment* DNA polimerase, presente no teste de LAMP previamente estabelecido (GOMES, YAGO, 2017), pela versão *Bst 2.0 WarmStart*, cuja atividade é inibida em temperaturas abaixo de 45°C. Concentrações de magnésio e de betaína, que influenciam a eficiência da reação de LAMP, foram ajustadas para o teste com a enzima *Bst 2.0 WarmStart*. Foram testadas concentrações de 3 a 6 mM de sulfato de magnésio (MgSO₄), que apresentaram resultados similares (Figura 11), e por isso foi selecionada a concentração de 4 mM. Em seguida, foram avaliadas concentrações de betaína de 0 a 1,6 M. A concentração de 0,2 M de betaína não impediu a geração de amplificação inespecífica, enquanto a concentração de 1,6 M inibiu a reação por completo (Figura 12). Por isso, foi selecionada a concentração intermediária de 0,8 M.

O desempenho das enzimas *Bst 2.0 WarmStart* e *Large Fragment* foi comparado com amostras de DNA de 31 portadores de HTLV-1. O teste de LAMP com a enzima *Bst Large Fragment* apresentou desempenho ligeiramente superior ao da *Bst 2.0 WarmStart* (Figura 13), sendo obtida sensibilidade de, respectivamente, 93,55% (29 positivos em 31 casos) e 87,10% (27 positivos em 31 casos) em relação ao resultado do diagnóstico definitivo.

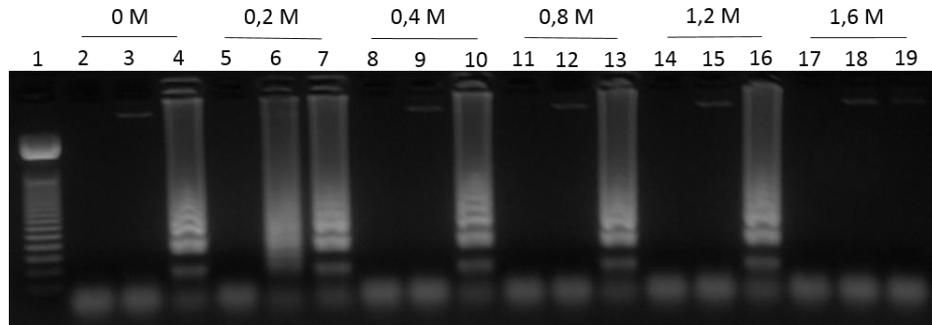
Figura 11 – Avaliação da concentração de magnésio na reação de LAMP para HTLV-1.



Legenda: Concentrações de magnésio variando de 3–6 mM foram testadas em reação com a enzima *Bst 2.0 WarmStart* DNA polimerase. As reações foram realizadas com 100 ng de DNA, e incubadas a 65°C por 1h. Eletroforese em gel de agarose a 2% com GelRed 0,5× em TBE 1× foi realizada a 100V por 1h usando 2 µL dos

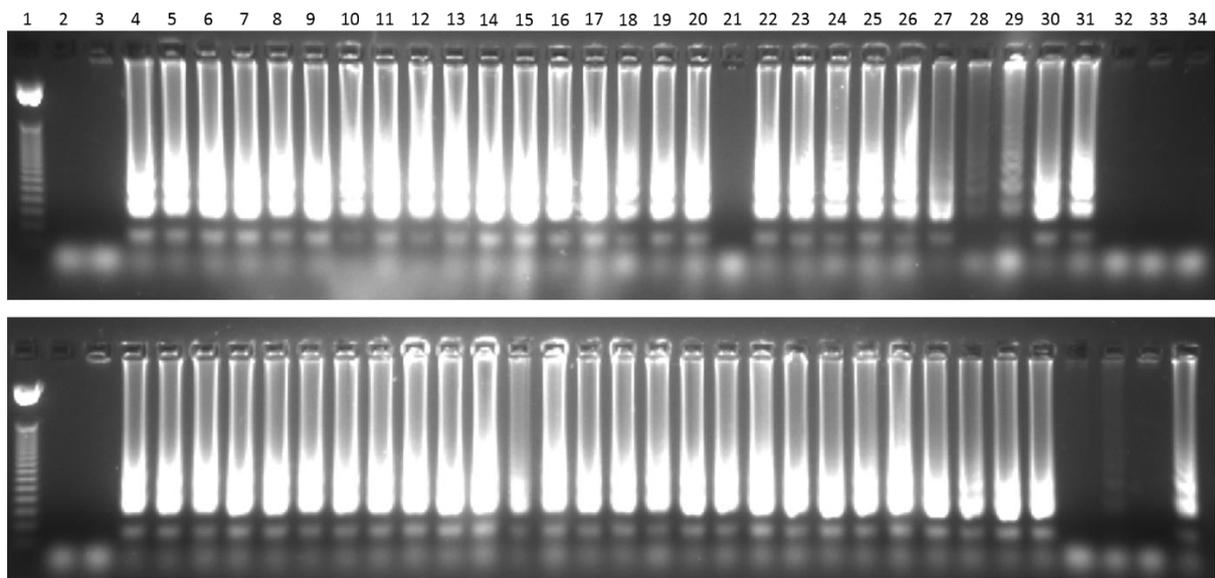
produtos das reações. Linha 1, peso molecular de 100-pb; linhas 2, 5, 8 e 11, controle negativo (água); linhas 3, 6, 9 e 12, controle negativo (DNA humano); linhas 4, 7, 10 e 13, amostra positiva para HTLV-1.

Figura 12 – Avaliação da concentração de betaína na reação de LAMP para HTLV-1.



Legenda: Reações com a enzima *Bst 2.0 WarmStart* DNA polimerase foram realizadas com concentrações de betaína de 0–1,6 M, em duplicata, e 100 ng de DNA, e incubadas 65°C por 1h. Eletroforese em gel de agarose a 2% com GelRed 0,5× em TBE 1× foi realizada a 100V por 1h com 2 µL dos produtos das reações. Linha 1, peso molecular de 100-pb; linhas 2, 5, 8, 11, 14 e 17, controle negativo (água); linhas 3, 6, 9, 12, 15 e 18, controle negativo (DNA humano); linhas 4, 7, 10, 13, 16 e 19, amostra positiva para HTLV-1.

Figura 13 – Comparação entre DNA polimerases *Bst 2.0 WarmStart* e *Large Fragment*.



Amostra	CPV (%)						
1	1,85	9	0,31	17	0,03	25	0,00
2	1,54	10	0,22	18	0,03	26	0,00
3	1,48	11	0,21	19	0,02	27	0,00
4	1,07	12	0,10	20	0,01	28	0,00
5	0,87	13	0,07	21	0,01	29	0,00
6	0,86	14	0,06	22	0,01	30	0,00
7	0,65	15	0,04	23	0,00	31	0,00
8	0,43	16	0,03	24	0,00		

Legenda: Reações foram realizadas com as enzimas *Bst 2.0 WarmStart* (acima) e *Bst Large Fragment*, (abaixo), com incubação a 65°C por 1h. Eletroforese em gel de agarose a 2% com GelRed 0,5× em TBE 1× foi realizada a 100V por 1h com 2 µL dos produtos das reações. Linha 1: peso molecular de 100-pb; linha 2: controle negativo (água); linha 3, controle negativo (DNA humano); linhas 4 a 34, amostras positivas para HTLV-1, numeradas de

1 a 31, com valores de carga proviral (CPV) em percentual de células infectadas em leucócitos de sangue periférico, conforme indicado no quadro associado.

6.2. Teste de LAMP para HTLV-1 e 2 em amostras do IAL

Considerado o desempenho superior da DNA polimerase *Bst Large Fragment* na amplificação da sequência-alvo de HTLV-1, essa enzima foi utilizada nos testes de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2 com as amostras de DNA fornecidas pelo IAL (n=92), cujos resultados estão descritos na Tabela Suplementar 1. Embora não utilizadas nos cálculos de acurácia e de sensibilidade, todas as amostras com resultado negativo na triagem com dois testes de ELISA (n=10) também se mostraram negativas nos testes de LAMP. Dessa forma, as análises seguintes foram realizadas com os resultados de 82 amostras.

De modo geral, a acurácia do teste de LAMP para HTLV-1/2 foi mais baixa em relação aos testes sorológicos (59,75%) se comparada com as técnicas moleculares (73,17%) (Tabela 3), o que também foi observado na análise realizada individualmente contra WB (57,32%), INNO-LIA (60,98%), qPCR (75,61%) e PCR-RFLP (75,31%) (Tabela 3). A acurácia do teste de LAMP para HTLV-1 utilizando-se como referência cada um dos diferentes métodos de diagnóstico, isoladamente, apresentou melhor desempenho na comparação à qPCR (80,49%), seguida da PCR-RFLP (76,54%) e dos testes de WB e INNO-LIA (74,39%) (Tabela 3). Em todas as comparações com outros métodos de diagnóstico, o teste de LAMP para HTLV-1 apresentou acurácia inferior no grupo de pacientes coinfectados com HIV e em uso de TARV (grupo G1) em relação ao grupo sem terapia (grupo G2). Além disso, a acurácia do teste de LAMP para HTLV-1 foi inferior à do teste para HTLV-2 em todas as situações, especialmente no grupo que faz uso de TARV. O teste de LAMP para HTLV-2 apresentou acurácia mais elevada em relação à combinação de testes moleculares (92,68%) do que a de testes sorológicos (80,49%); assim como em relação à qPCR (92,68%) e à PCR-RFLP (96,30%) se comparadas ao WB (82,93%) e INNO-LIA (81,71%), separadamente (Tabela 3).

O teste de LAMP para HTLV-1 apresentou resultados discrepantes dos demais métodos de diagnóstico confirmatório, principalmente em indivíduos em uso de TARV (Tabela 4). O teste de LAMP para HTLV-1 neste grupo apresentou concordância razoável com o WB (0,34) e com o INNO-LIA (0,29), e moderada ou razoável em relação à qPCR (0,42) ou à PCR-RFLP (0,33), respectivamente (Tabela 4). Por outro lado, no grupo que não faz o uso de terapia, foi obtida uma concordância substancial com os testes moleculares (Tabela 4: *kappa* de 0,79 com a qPCR e 0,80 com a PCR-RFLP). Já a concordância total do teste de LAMP para HTLV-2

com a PCR-RFLP foi considerada quase perfeita (0,90), e substancial em comparação com a qPCR (0,80) (Tabela 4).

Tabela 3 – Acurácia dos testes de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2.

LAMP	Vírus	Testes sorológicos	Testes moleculares	WB	INNO-LIA	qPCR	PCR-RFLP
Total	HTLV-1/2	59,76 (48,34 a 70,44)	73,17 (62,24 a 82,36)	57,32 (45,91 a 68,18)	60,98 (49,57 a 71,56)	75,61 (64,88 a 84,42)	75,31 (64,67 a 84,22)
	HTLV-1	75,61 (64,88 a 84,42)	78,05 (67,54 a 86,44)	74,39 (63,56 a 83,84)	74,39 (63,56 a 83,40)	80,49 (70,26 a 88,42)	76,54 (65,82 a 85,25)
	HTLV-2	80,49 (70,26 a 88,42)	92,68 (84,75 a 97,27)	82,93 (73,02 a 90,34)	81,71 (71,63 a 89,38)	92,68 (84,75 a 97,27)	96,30 (89,56 a 99,23)
G1	HTLV-1/2	50,00 (35,23 a 64,77)	66,67 (51,59 a 79,60)	56,25 (41,18 a 70,52)	52,08 (37,19 a 66,71)	66,67 (51,59 a 79,60)	66,67 (51,59 a 79,60)
	HTLV-1	66,67 (51,59 a 79,60)	72,92 (58,15 a 84,72)	66,67 (51,59 a 79,60)	64,58 (49,46 a 77,84)	72,92 (58,15 a 84,72)	66,67 (51,59 a 79,60)
	HTLV-2	81,25 (67,37 a 91,05)	93,75 (82,80 a 98,69)	85,42 (72,24 a 93,93)	77,08 (62,69 a 87,97)	91,67 (80,02 a 97,68)	97,92 (88,93 a 99,95)
G2	HTLV-1/2	73,53 (55,64 a 87,12)	82,35 (65,47 a 93,24)	67,65 (49,47 a 82,61)	76,47 (58,83 a 89,25)	88,24 (72,55 a 96,70)	87,88 (71,80 a 96,60)
	HTLV-1	88,24 (72,55 a 96,70)	94,12 (80,32 a 99,28)	85,29 (68,94 a 95,05)	88,24 (72,55 a 96,70)	91,18 (76,32 a 98,14)	90,91 (75,67 a 98,08)
	HTLV-2	85,29 (68,94 a 95,05)	91,18 (76,32 a 98,14)	79,41 (62,10 a 91,30)	88,24 (72,55 a 96,70)	94,12 (80,32 a 99,28)	93,94 (79,77 a 99,26)

Notas: Valores de acurácia (%), e do intervalo de confiança 95% entre parênteses, dos testes de LAMP calculadas em relação aos resultados de diferentes testes de diagnóstico. WB, Western blot; INNO-LIA, Imunoensaio em linha, qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição. G1, pacientes coinfectados com HIV em uso de TARV (n=48). G2, pacientes coinfectados com HIV sem uso de TARV (n=34).

Tabela 4 – Índice de concordância entre o teste de LAMP e outros métodos de diagnóstico.

LAMP	Vírus	WB	INNO-LIA	qPCR	PCR-RFLP
Total	HTLV-1/2	0,12 (-0,06 a 0,31)	0,19 (0,06 a 0,031)	0,51 (0,32 a 0,69)	0,50 (0,32 a 0,68)
	HTLV-1	0,47 (0,28 a 0,66)	0,47 (0,28 a 0,66)	0,57 (0,38 a 0,76)	0,50 (0,31 a 0,69)
	HTLV-2	0,54 (0,33 a 0,75)	0,59 (0,418 a 0,76)	0,80 (0,65 a 0,95)	0,90 (0,78 a 1,00)
G1	HTLV-1/2	0,11 (-0,13 a 0,35)	0,04 (-0,13 a 0,21)	0,33 (0,07 a 0,60)	0,33 (0,7 a 0,59)
	HTLV-1	0,34 (0,09 a 0,059)	0,29 (0,03 a 0,55)	0,42 (0,15 a 0,68)	0,33 (0,06 a 0,58)
	HTLV-2	0,54 (0,25 a 0,84)	0,47 (0,23 a 0,70)	0,73 (0,48 a 0,98)	0,92 (0,77 a 1,00)
G2	HTLV-1/2	0,33 (0,01 a 0,65)	0,49 (0,23 a 0,78)	0,76 (0,53 a 0,97)	0,75 (0,53 a 0,97)
	HTLV-1	0,66 (0,38 a 0,93)	0,73 (0,49 a 0,98)	0,79 (0,53 a 0,97)	0,80 (0,54 a 1,00)
	HTLV-2	0,52 (0,21 a 0,83)	0,75 (0,52 a 0,97)	0,87 (0,69 a 1,00)	0,86 (0,68 a 1,00)

Notas: Nível de concordância pelo índice *Kappa* de Cohen com o intervalo de confiança 95% indicado entre parênteses. WB, Western blot; INNO-LIA, Imunoensaio em linha, qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição; IND, indefinido. G1, pacientes coinfectados por HIV em uso de TARV (N=48). G2, pacientes coinfectados por HIV sem o uso de TARV (n=34).

Amostras de HTLV-2 com resultado positivo no teste de LAMP em indivíduos com e sem TARV apresentaram carga proviral relativa 59,71 e 18,38 vezes maior do que amostras com resultado negativo, respectivamente (Tabela 5). Por outro lado, tal diferença não foi observada nas amostras de HTLV-1, em que amostras dos dois grupos com resultado positivo no teste de LAMP apresentaram níveis de carga proviral relativa ligeiramente inferior às das amostras com resultado negativo (Tabela 5), sugerindo problemas na eficiência dos iniciadores.

Tabela 5 – Carga proviral relativa de HTLV-1/2 conforme resultados do teste de LAMP.

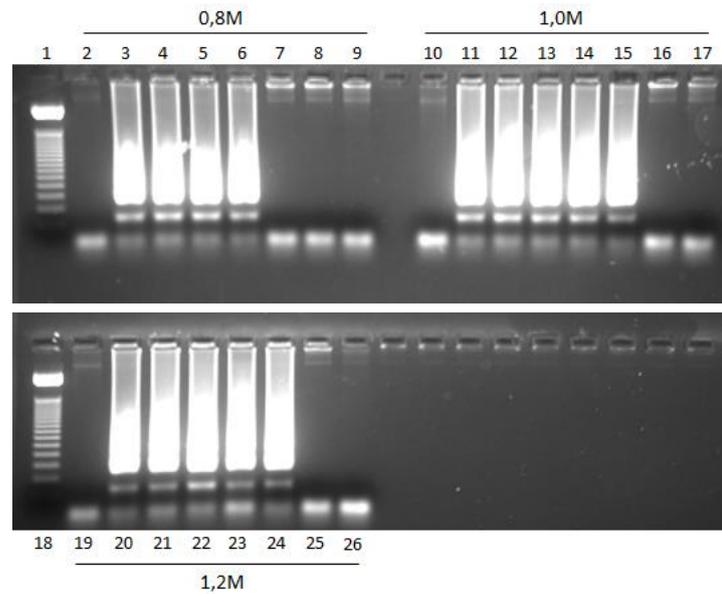
Grupos	LAMP - HTLV-1		LAMP - HTLV-2		
	Negativo (n=7)	Positivo (n=11)	Negativo (n=3)	Positivo (n=7)	
G1	Média Ct_{pol}	33,57	34,55	39,00	33,14
	Média Ct_{alb}	26,86	26,91	27,67	27,71
	ΔCt	6,71	7,64	11,33	5,43
	$\Delta\Delta Ct$	0	0,93	0	-5,90
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00	0,53	1,00	59,71
G2		Negativo (n=3)	Positivo (n=9)	Negativo (n=2)	Positivo (n=10)
	Média Ct_{pol}	30,00	29,89	39,00	31,00
	Média Ct_{alb}	25,50	23,89	26,50	22,70
	ΔCt	4,50	6,00	12,50	8,30
	$\Delta\Delta Ct$	0	1,50	0	-4,20
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00	0,35	1	18,38	

Notas: Cálculo de quantificação relativa pelo método de delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). G1, pacientes coinfectados por HIV em uso de TARV. G2, pacientes coinfectados por HIV sem o uso de TARV.

6.3. Desenho e padronização de novos iniciadores de LAMP para HTLV-1

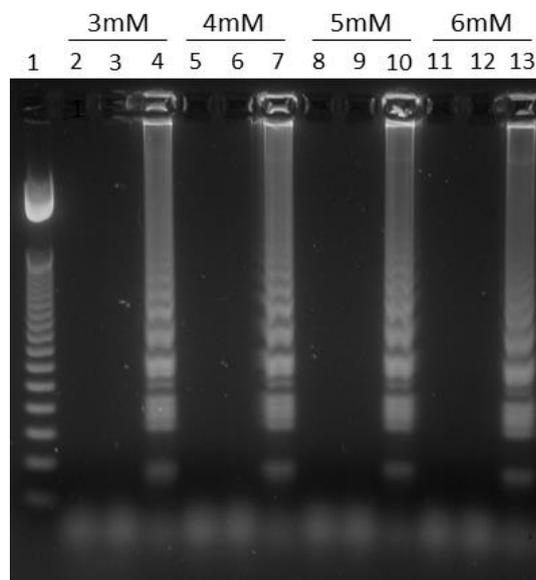
Para melhorar a eficiência do teste de LAMP na detecção de HTLV-1, um novo conjunto de iniciadores foi desenhado a partir da sequência do gene *tax* da linhagem ATK (GenBank J02029). Foram obtidos 100 conjuntos, cada um deles contendo iniciadores FIP, BIP, F3 e B3, que foram testados *in silico*, individualmente, para a formação de dímeros e de estruturas de *hairpin*. O conjunto de iniciadores com os melhores resultados de acordo com os parâmetros definidos foi utilizado no desenho dos iniciadores LF e LB. Na Tabela 6, estão apresentadas as sequências dos iniciadores obtidos, que amplificam um fragmento de 135-pb, e na Figura 14 estão indicadas suas respectivas posições em relação à sequência da linhagem ATK.

Figura 15 – Padronização da concentração de betaína na reação de LAMP para HTLV-1.



Legenda: As reações com os novos iniciadores foram realizadas a 65°C por 1h com concentrações de betaína de 0,8 M, 1,0 M e 1,2 M, e com 100 ng de DNA de portadores de HTLV-1 com carga proviral indetectável por qPCR. O resultado foi revelado por corrida de eletroforese em gel de agarose a 2% em 1× TBE, com 2 µL dos produtos das reações, a 100V por 1h. Linha 1 e 18: peso molecular de 100-pb; linhas 2, 10 e 19: amostra negativa para HTLV-1; linhas 3, 4, 5, 11, 12, 13, 20, 21 e 22: amostras positivas no teste de LAMP para HTLV-1 com iniciadores antigos; linhas 6-9, 14-17 e 23-26: amostras negativas no teste de LAMP para HTLV-1 com iniciadores antigos.

Figura 16 – Padronização da concentração de magnésio na reação de LAMP para HTLV-1.



Legenda: As reações com os novos iniciadores foram realizadas a 65°C por 1h com concentrações de magnésio de 3, 4, 5 e 6 mM, e com 100 ng de DNA de paciente positivo para HTLV-1. O resultado foi revelado por corrida de eletroforese em gel de agarose a 2% em 1× TBE, com 2 µL dos produtos das reações, a 100V por 1h. Linha 1: peso molecular de 100-pb; linhas 2, 5, 8 e 11: controle negativo (água); linhas 3, 6, 9 e 12: amostra de DNA negativa para HTLV-1; linhas 4, 7, 10 e 13: amostra de DNA positiva para HTLV-1.

6.4. Teste de LAMP com novos iniciadores para HTLV-1 em amostras do IAL

Amostras de DNA do IAL foram submetidas ao teste de LAMP para HTLV-1 com novos iniciadores e, por isso, foram recalculados a acurácia e os índices de concordância. De 39 amostras de HTLV-1, conforme diagnóstico de referência, 16 haviam sido negativas no teste de LAMP. Após a reavaliação com novos iniciadores, oito amostras inicialmente negativas apresentaram resultado positivo. Por consequência, a acurácia do teste de LAMP para HTLV-1 passou de 78,05% (Tabela 3) para 95,12% na comparação com os testes moleculares (Tabela 7), e de 75,61% (Tabela 3) para 90,24% na comparação com os testes sorológicos (Tabela 7). O teste de LAMP para HTLV-1 com os novos iniciadores apresentou níveis mais elevados de acurácia na comparação com a qPCR, subindo de 80,49% (Tabela 3) para 92,68% (Tabela 7), seguida da PCR-RFLP, que passou de 76,54% (Tabela 3) para 91,36% (Tabela 7), e dos testes de WB e INNO-LIA, com elevação de 74,39% (Tabela 3) para 89,02% (Tabela 7).

A estratificação dos resultados pelo uso de TARV revelou que a acurácia de LAMP para HTLV-1 com novos iniciadores se manteve sistematicamente menor em pacientes em TARV na comparação com o grupo sem tratamento (Tabela 7). Por outro lado, a acurácia de LAMP para HTLV-1 com novos iniciadores (Tabela 7) se mostrou superior na comparação com iniciadores de estudo prévio (Tabela 3). Uma vez que os resultados de LAMP para HTLV-1 foram alterados com a mudança de iniciadores, foi recalculada a acurácia dos testes de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2 juntos (Tabela 7). Na comparação com testes moleculares, a acurácia passou de 73,17% (Tabela 3) para 85,37% (Tabela 7), enquanto na comparação com testes sorológicos, subiu de 59,76% (Tabela 3) para 68,29% (Tabela 7). Esta melhoria na performance dos testes de LAMP também foi evidenciada na comparação individualizada com os demais testes, e na avaliação estratificada de acordo com o uso de TARV (Tabela 7).

Tabela 7 – Acurácia do teste de LAMP com novos iniciadores para HTLV-1.

Vírus	LAMP	Testes Sorológicos	Testes Moleculares	WB	INNO-LIA	qPCR	PCR-RFLP
HTLV-1	Total (n=82)	90,24 (81,68 a 95,69)	95,12 (87,98 a 98,66)	89,02 (80,18 a 94,86)	89,02 (80,18 a 94,86)	92,68 (84,75 a 97,27)	91,36 (83,00 a 96,45)
	G1 (n=48)	85,42 (72,24 a 93,33)	91,67 (80,02 a 97,68)	87,50 (74,75 a 95,27)	85,42 (72,24 a 93,93)	89,58 (77,34 a 96,53)	87,50 (74,75 a 95,27)
	G2 (n=34)	94,12 (80,32 a 99,28)	97,06 (84,67 a 99,93)	88,24 (72,55 a 96,70)	91,18 (76,32 a 98,14)	94,12 (80,32 a 99,28)	96,97 (84,24 a 99,92)
HTLV-1/2	Total (n=82)	68,29 (57,08 a 78,13)	85,37 (75,83 a 92,20)	67,07 (55,81 a 77,06)	68,29 (57,08 a 78,13)	85,37 (75,83 a 92,20)	87,65 (78,47 a 93,92)
	G1 (n=48)	60,42 (45,27 a 74,23)	85,42 (72,24 a 93,93)	64,58 (49,46 a 77,84)	60,42 (45,27 a 74,23)	81,25 (67,37 a 91,05)	85,42 (72,24 a 93,93)
	G2 (n=34)	76,47 (58,83 a 89,25)	85,29 (68,94 a 95,05)	70,59 (52,52 a 84,90)	79,41 (62,10 a 91,30)	91,18 (76,32 a 98,14)	90,91 (75,67 a 98,08)

Notas: Valores de acurácia (%), com o intervalo de confiança (95%) entre parênteses, dos testes de LAMP calculadas em relação aos resultados de diferentes testes de diagnóstico. WB, Western blot; INNO-LIA, Imunoensaio em linha, qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição. G1, pacientes coinfectados com HIV em uso de TARV (n=48). G2, pacientes coinfectados com HIV sem uso de TARV (n=34).

Com a troca dos iniciadores para HTLV-1, também foi necessária a reavaliação dos coeficientes de concordância dos diferentes métodos de diagnóstico confirmatório com o teste de LAMP para HTLV-1 (Tabela 8), ou ainda de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2 combinados (Tabela 8). Considerando apenas o teste para HTLV-1, foi observada uma concordância substancial entre o teste de LAMP e todos os demais testes de referência (Tabela 8). Novamente, os níveis de concordância dos resultados do teste de LAMP foram sistematicamente inferiores no grupo em TARV em relação ao grupo sem tratamento, embora tenham sido observados índices de concordância substancial (entre 0,61 e 0,80) no primeiro e de substancial a quase perfeita (entre 0,81 e 1) no segundo (Tabela 8). A concordância do teste de LAMP foi maior com testes moleculares, com valor de 0,79 com a qPCR, e de 0,77 com a PCR-RFLP, do que com testes sorológicos, de 0,73 com o WB e INNO-LIA (Tabela 8).

Tabela 8 – Índice de concordância (*Kappa*) do teste de LAMP para HTLV-1.

Vírus	LAMP	WB	INNO-LIA	qPCR	PCR-RFLP
HTLV-1	Total (n=82)	0,77 (0,63 a 0,91)	0,77 (0,63 a 0,91)	0,84 (0,72 a 0,94)	0,77 (0,63 a 0,91)
	G1 (n=48)	0,75 (0,57 a 0,94)	0,67 (0,47 a 0,88)	0,78 (0,61 a 0,96)	0,75 (0,56 a 0,94)
	G2 (n=34)	0,73 (0,48 a 0,98)	0,80 (0,59 a 1,00)	0,87 (0,68 a 1,00)	0,93 (0,78 a 1,00)
HTLV-1/2	Total (n=82)	0,26 (0,06 a 0,46)	0,24 (0,08 a 0,40)	0,69 (0,53 a 0,85)	0,69 (0,59 a 0,89)
	G1 (n=48)	0,16 (-0,07 a 0,39)	0,00	0,61 (0,38 a 0,87)	0,69 (0,48 a 0,90)
	G2 (n=34)	0,38 (0,06 a 0,70)	0,54 (0,27 a 0,81)	0,81 (0,61 a 1,00)	0,81 (0,61 a 1,00)

Notas: Nível de concordância pelo índice *Kappa* de Cohen com o intervalo de confiança (95%) indicado entre parênteses. WB, Western blot; INNO-LIA, Imunoensaio em linha, qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição; IND, indefinido. G1, pacientes coinfectados por HIV em uso de TARV (N=48). G2, pacientes coinfectados por HIV sem o uso de TARV (n=34).

Considerando os resultados de LAMP para HTLV-1 e 2, foi observada maior variação da concordância com os demais testes, especialmente em relação aos testes sorológicos (Tabela 8). Enquanto a comparação com os testes moleculares resultou em índices considerados substanciais, com valores de 0,69 em relação à qPCR e de 0,70 com a PCR-RFLP, a comparação com testes sorológicos retornou índices muito baixos, com valores de 0,26 e de 0,24 para o WB e o INNO-LIA, respectivamente (Tabela 8). Na análise de concordância entre o teste de LAMP e INNO-LIA foi obtido um índice de 0,00 no grupo em uso de TARV, pois a contagem de casos

definidos como verdadeiro negativo foi nula, dado que todas as amostras tiveram conclusão do diagnóstico.

Foi determinada a acurácia e a sensibilidade dos testes sorológicos (WB e INNO-LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) utilizados pelo IAL (Tabelas Suplementares 2, 3 e 4). Como definido anteriormente, dez amostras negativas por ELISA não foram incluídas na análise, pois não haviam sido submetidas aos testes confirmatórios no estudo original, assim como não seriam avaliadas na rotina clínica, reduzindo com isso o tamanho da amostra para 82 indivíduos. Testes sorológicos apresentaram maior acurácia do que testes moleculares, sendo obtidos valores de 98,78% e 80,49%, respectivamente (Tabela Suplementar 2). Foi observada uma sensibilidade de 98,70% para os testes sorológicos e de 79,22% para os testes moleculares. Individualmente, o teste de INNO-LIA apresentou a melhor performance, com acurácia de 97,56% e sensibilidade de 97,40%, seguido do WB, que apresentou valores de acurácia e sensibilidade de 84,15% e 83,12%, respectivamente (Tabela Suplementar 3). Quanto aos métodos moleculares, a PCR-RFLP apresentou valores de acurácia e sensibilidade de, respectivamente, 70,37% e 68,42%, que se mostraram similares aos da qPCR, com 68,29% e 66,23%, respectivamente (Tabela Suplementar 4). Com amostras do IAL, os testes de LAMP para HTLV-1/2 apresentaram acurácia de 65,85% e sensibilidade de 63,64% (Tabela 9). A acurácia e sensibilidade de LAMP para HTLV-1 (90,24% e 79,49%, respectivamente) se mostraram superiores às do teste para HTLV-2 (79,27% e 51,43%, respectivamente) (Tabela 9). Como mostrado anteriormente, a acurácia e sensibilidade de LAMP foram mais elevadas na população de pacientes sem TARV (grupo G2) (Tabela 9).

Na comparação do teste de LAMP (Tabela 9) com a qPCR e PCR-RFLP (Tabela Suplementar 2), LAMP mostrou desempenho similar aos demais; a detecção de HTLV-1 foi ligeiramente superior à qPCR, que apresentou acurácia de 87,80% e sensibilidade de 74,39%, e à PCR-RFLP, que teve acurácia 88,89% e sensibilidade de 81,58%, enquanto a detecção de HTLV-2 foi ligeiramente inferior (Tabela Suplementar 2, qPCR: acurácia de 84,15% e sensibilidade de 62,86%; PCR-RFLP: acurácia de 80,25% e sensibilidade de 54,29%).

Tabela 9 – Acurácia e sensibilidade do teste de LAMP em amostras de pacientes do IAL coinfectados.

Grupo	Vírus	Resultado	LAMP			
			+	-	Acurácia (%)	Sensibilidade (%)
Total	HTLV-1/2	+	49	28	65,85	63,64
		-	0	5	(54,55 a 75,97)	(51,88 a 74,30)
	HTLV-1	+	31	8	90,24	79,49
		-	0	43	(81,68 a 95,69)	(63,54 a 90,70)
	HTLV-2	+	18	17	79,27	51,43
		-	0	47	(68,89 a 87,43)	(33,99 a 68,62)
G1	HTLV-1/2	+	29	19	60,42	60,42
		-	0	0	(45,27 a 74,23)	(45,27 a 74,23)
	HTLV-1	+	21	6	87,50	77,78
		-	0	21	(74,75 a 95,27)	(57,74 a 91,38)
	HTLV-2	+	8	11	77,08	42,11
		-	0	29	(62,69 a 87,97)	(20,25 a 66,50)
G2	HTLV-1/2	+	20	9	73,53	68,97
		-	0	5	(55,64 a 87,12)	(49,17 a 84,72)
	HTLV-1	+	10	2	94,12	83,33
		-	0	22	(80,32 a 99,28)	(51,59 a 97,91)
	HTLV-2	+	10	6	82,35	62,50
		-	0	18	(65,47 a 93,24)	(35,43 a 84,80)

Notas: Valores de acurácia e sensibilidade (%), com o intervalo de confiança (95%) entre parênteses, calculados a partir de tabelas de contingência construídas com resultados de LAMP utilizando-se como referência o diagnóstico final obtido por Campos et al. (2017). O teste de PCR-RFLP, particularmente, não foi realizado em uma amostra do grupo G2, totalizando 81 amostras na análise desta técnica. PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição. qPCR, PCR em tempo real; G1, pacientes coinfectados com HIV em uso de TARV (n=48). G2, pacientes coinfectados com HIV sem uso de TARV (n=34).

6.5. Teste de LAMP em amostras de indivíduos mono infectados por HTLV-1 e 2

Após realizadas as análises com amostras do IAL de indivíduos co-infectados com HIV, amostras de 144 indivíduos do INI/FIOCRUZ, mono infectados por HTLV-1 ou HTLV-2, foram avaliadas (Tabela Suplementar 5). O teste de LAMP para HTLV-1/2 apresentou boa acurácia em relação aos resultados obtidos por WB (89,26%), qPCR (89,58%), e PCR-RFLP (87,50%) (Tabela 10). O cálculo de acurácia de LAMP para HTLV-1 e 2, separadamente, demonstrou uma superioridade do teste para HTLV-1, com valores de 91,35%, 92,80% e 89,60% na comparação com o WB, a qPCR e a PCR-RFLP, respectivamente; enquanto isso, LAMP para HTLV-2 mostrou níveis de acurácia de, respectivamente, 70,59%, 68,42% e 73,68% contra os mesmos testes (Tabela 10).

Tabela 10 – Acurácia do teste de LAMP nas amostras do INI.

Vírus	WB (n=121)			qPCR (n=144)			PCR-RFLP (n=144)		
	+	-	Acurácia	+	-	Acurácia	+	-	Acurácia
HTLV-1/2	+ 105	0	89,26	114	14	89,58	122	6	87,50
	- 13	3	(82,33 a 94,15)	1	15	(83,40 a 94,05)	12	4	(80,97 a 92,42)
LAMP HTLV-1	+ 93	1	91,35	107	8	92,80	112	3	89,60
	- 8	2	(84,21 a 95,97)	1	9	(86,77 a 96,65)	10	0	(82,87 a 94,35)
HTLV-2	+ 12	0	70,59	7	6	68,42	10	3	73,68
	- 5	0	(44,04 a 89,69)	0	6	(43,45 a 87,42)	2	4	(48,80 a 90,85)

Notas: Valores de acurácia (%) dos testes de LAMP calculados em relação aos resultados de diferentes testes de diagnóstico. WB, Western blot; qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição.

Posteriormente, foi calculado o índice *kappa* de Cohen de concordância dos testes de LAMP com cada um dos testes empregados em amostras de pacientes do INI. O índice mais alto foi observado em comparação com a qPCR (0,61), particularmente na reação para HTLV-1 (0,63), sendo classificado como substancial, ao mesmo tempo em que foi considerado moderado no teste para HTLV-2 (0,42) (Tabela 11). Da mesma forma, no teste de LAMP para HTLV-2, a concordância com a PCR-RFLP também apresentou índice moderada (entre 0,41 e 0,60) (Tabela 11). Todas as demais comparações resultaram em índices considerados razoável (entre 0,21 e 0,40) ou mínimo (abaixo de 0,20). Nas análises de concordância do teste de LAMP com o WB e a PCR-RFLP foram obtidos índices nulo e de -0,04, respectivamente, pois, mais uma vez, a contagem de casos do grupo verdadeiro negativo foi nula, já que todas os pacientes apresentaram conclusão do diagnóstico para um dos tipos virais.

Tabela 11 – Índice de concordância (*Kappa*) do teste de LAMP com amostras do INI.

Vírus	WB (%)	qPCR (%)	PCR-RFLP (%)	
LAMP	HTLV-1/2	0,29 (0,03 a 0,54)	0,61 (0,44 a 0,78)	0,24 (0,00 a 0,48)
	HTLV-1	0,28 (-0,05 a 0,60)	0,63 (0,41 a 0,85)	-0,04 (-0,07 a -0,04)
	HTLV-2	0,00	0,42 (0,11 a 0,74)	0,42 (-0,09 a 0,84)

Notas: Nível de concordância pelo índice *Kappa* de Cohen com o intervalo de confiança 95% indicado entre parênteses. WB, Western blot; qPCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR-RFLP, PCR e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição; IND, indefinido.

Na amostra de pacientes do INI, todos os indivíduos apresentaram resultado conclusivo de infecção por HTLV-1 ou HTLV-2. Por isso, somente os valores de sensibilidade foram calculados para as técnicas de diagnóstico confirmatório usando-se como referência o diagnóstico definitivo obtido na avaliação combinada por WB e PCR-RFLP. O teste de WB se mostrou o mais sensível, com taxa de 98,35% (Tabela 12), e com valores de 98,08% e 100% na detecção específica de HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente. Na avaliação dos testes moleculares, a PCR-RFLP apresentou a maior sensibilidade, com 93,06%, seguida dos testes de LAMP e de qPCR, com taxas de sensibilidade de 88,89% e 79,86%, respectivamente. Na identificação de portadores de infecção por HTLV-1, esta mesma dinâmica se manteve, em que a PCR-RFLP apresentou maior sensibilidade, com taxa de 97,60%, enquanto os testes de LAMP para HTLV-1 e a qPCR apresentaram sensibilidade de 92,00% e 86,40%, respectivamente. Por outro lado, dentre os testes moleculares, o teste de LAMP para HTLV-2 apresentou a maior taxa de sensibilidade, no valor de 68,42%, seguido da PCR-RFLP e da qPCR, que resultaram em valores de 63,16% e 36,84%, respectivamente.

Tabela 12 – Sensibilidade dos testes de WB, qPCR, PCR-RFLP e LAMP em amostras de pacientes do INI.

Grupos	WB (n=121)			qPCR (n=144)			PCR-RFLP (n=144)			LAMP (n=144)			
	+	-	Sensibilidade	+	-	Sensibilidade	+	-	Sensibilidade	+	-	Sensibilidade	
HTLV-1/2	+	119	2	98,35	115	29	79,86	134	10	93,06	128	16	88,89
	-	0	0	(94,16 a 99,80)	0	0	(72,37 a 86,08)	0	0	(87,60 a 96,62)	0	0	(82,89 a 93,51)
HTLV-1	+	102	2	98,08	108	17	86,40	122	3	97,60	115	10	92,00
	-	0	0	(93,23 a 99,77)	0	0	(79,12 a 91,87)	0	0	(93,15 a 99,50)	0	0	(85,78 a 96,10)
HTLV-2	+	17	0	100	7	12	36,84	12	7	63,16	13	6	68,42
	-	0	0	(80,49 a 100,00)	0	0	(16,29 a 61,64)	0	0	(38,36 a 83,71)	0	0	(43,45 a 87,42)

Notas: Valores de sensibilidade (%) calculados a partir de tabelas de contingência construídas com resultados de LAMP utilizando-se como referência o diagnóstico definitivo obtido a partir da combinação dos resultados de WB e PCR-RFLP. WB, *Western blot*; PCR-RFLP, reação em cadeia da polimerase e ensaio de polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição; qPCR, PCR em tempo real.

6.6. Custo de algoritmos para o diagnóstico confirmatório de HTLV-1/2

Na Tabela 13 são apresentados os custos de diferentes algoritmos para o diagnóstico confirmatório. Dentre os algoritmos, a combinação de LAMP revelado por SYBR Green I, com a realização de WB nas amostras negativas apresentou o menor custo. Contudo, o uso de LAMP em conjunto com INNO-LIA resultou no diagnóstico de sete amostras a mais na comparação do teste de LAMP associado ao WB (Tabela Suplementar 1, IDs: 18, 19, 22, 25, 28, 37 e 83). Além disso, em todas as combinações, o teste de LAMP apresentou melhor custo (R\$ 9,99) que os demais testes moleculares, custando cerca de metade do valor da qPCR (R\$ 18,79) e da PCR-RFLP (R\$ 19,45).

De modo geral, os algoritmos convencionais apresentaram custo mais elevado em relação aos algoritmos alternativos iniciados por técnicas moleculares. Esta diferença foi ainda maior quando utilizado o INNO-LIA em substituição ao WB.

Tabela 13 – Custo de algoritmos para o diagnóstico confirmatório de HTLV-1/2.

Algoritmo convencional			
Testes	INNO-LIA + qPCR	INNO-LIA + PCR-RFLP	INNO-LIA + LAMP
Quantidade	82 + 13	82 + 13	82 + 13
Custo total	R\$ 13.446,33	R\$ 13.454,87	R\$ 13.331,82
Testes	WB + qPCR	WB + PCR-RFLP	WB + LAMP
Quantidade	82 + 24	82 + 24	82 + 24
Custo total	R\$ 10.701,06	R\$ 10.716,84	R\$ 10.489,67
Algoritmo alternativo			
Testes	qPCR + LIA	PCR-RFLP + LIA	LAMP + LIA
Quantidade	82 + 31	82 + 29	82 + 33
Custo total	R\$ 6.532,13	R\$ 6.264,03	R\$ 6.131,88
Testes	qPCR + WB	PCR-RFLP + WB	LAMP + WB
Quantidade	82 + 31	82 + 29	82 + 33
Custo total	R\$ 5.416,13	R\$ 5.220,03	R\$ 4.943,88

Notas: Foram definidos dois algoritmos centrais, denominados convencional (iniciado por testes sorológicos) e alternativo (iniciado por testes moleculares), levando em consideração o diagnóstico de amostras do IAL (n=82). No algoritmo convencional, amostras com padrão indeterminado ou positivo, porém sem definição do tipo viral, nos métodos sorológicos (INNO-LIA ou WB) seguiram para teste por métodos moleculares (qPCR, PCR-RFLP ou LAMP). No algoritmo alternativo, as amostras com resultado negativo nos métodos moleculares foram testadas por testes sorológicos. O custo do teste de LAMP consiste na reação revelada com o corante SYBR Green I.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, a técnica de LAMP foi testada em amostras de DNA de portadores de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 que possuíam diagnóstico definido por diferentes técnicas, e provenientes de dois centros de saúde: IAL, em São Paulo, e o INI, no Rio de Janeiro. As amostras do IAL haviam sido coletadas de indivíduos infectados com HIV para um estudo de avaliação da performance de diferentes métodos de diagnóstico para HTLV-1/2 nesta população (CAMPOS et al., 2017), enquanto amostras de DNA armazenadas no LAPCLIN-NEURO do INI haviam sido coletadas para o acompanhamento de uma coorte de portadores de infecção por HTLV-1 e 2. Desta forma, comparamos os resultados obtidos pelo teste de LAMP com as demais técnicas usadas no diagnóstico confirmatório das infecções por HTLV-1 e 2.

Tendo em vista que o material genético fornecido pelo IAL era finito, limitando assim a repetição de ensaios, o teste de LAMP deveria apresentar alta eficiência. O mesmo fabricante da DNA polimerase *Bst Large Fragment* utilizada na reação de LAMP dispõe de uma versão denominada *Bst 2.0 WarmStart*, que representa um homólogo recombinante desenhado *in silico* a partir da DNA polimerase I do *Bacillus stearothermophilus*. A enzima *Bst 2.0 WarmStart* é ligada reversivelmente a um inibidor da sua atividade, que se dissocia a temperaturas acima de 45°C, liberando assim a ação de síntese de DNA pela enzima. Esta característica é vantajosa quando comparada à *Bst Large Fragment*, que é mantida inativa até o início da reação por incubação em banho de gelo. Além disso, conforme descrição do fabricante, esta nova geração da enzima apresenta maior atividade e menor taxa de amplificação inespecífica (TANNER; ZHANG; EVANS, 2015). Por isso, a substituição da DNA polimerase *Bst Large Fragment* pela versão *Bst 2.0 WarmStart* poderia melhorar a execução dos testes de LAMP para HTLV-1/2.

No entanto, inicialmente, foi necessário otimizar as condições de reação com esta nova enzima, particularmente, as concentrações de magnésio, que é um cofator da atividade de DNA polimerases, e de betaína, que é um facilitador da etapa de amplificação por reduzir a formação de estruturas secundárias presentes em regiões do DNA ricas em GC (HENKE et al., 1997). De acordo com LIU; DONG; LIU (2015), regiões com baixo conteúdo GC são amplificadas com maior eficiência na presença de baixos níveis de betaína (inferior a 0,4 M). Contudo, o provírus de HTLV-1 apresenta alto conteúdo de GC (cerca de 53%), o mesmo percentual observado no gene *tax* (ZANELLA et al., 2016), enquanto a sequência-alvo deste gene na reação de LAMP apresenta conteúdo de 56,1% (GOMES, YAGO, 2017). Por isso, diferentes concentrações de betaína foram avaliadas nas reações de LAMP para HTLV-1 com a enzima *Bst 2.0 WarmStart*.

Embora o uso de diferentes concentrações de magnésio não tenha surtido efeito na capacidade de detecção de HTLV-1, a presença de betaína em baixa concentração não impediu a geração de amplificação inespecífica, provavelmente, por permitir a ligação dos iniciadores com regiões de DNA que não representavam seus alvos. Por outro lado, concentrações elevadas de betaína podem inibir a amplificação, como observamos na reação com 1,6 M, pois, segundo MA et al. (2017), a betaína funciona como uma barreira na hibridização molecular, tornando instáveis as pontes de hidrogênio formadas entre o DNA e os iniciadores. Por isso, foi escolhida uma concentração intermediária de betaína (0,8 M), a mesma estabelecida na realização dos testes de LAMP com iniciadores previamente descritos (GOMES, YAGO, 2017).

Na comparação de reações de LAMP para HTLV-1 com as DNA polimerases *Bst Large Fragment* e *Bst 2.0 WarmStart*, foram selecionadas amostras de DNA de pacientes com diagnóstico de infecção por HTLV-1, que apresentavam carga proviral detectável, variando de 0,01% a 1,85% (n=22) ou com níveis indetectáveis (n=9), o que representa uma frequência de células de sangue periférico carregando o provírus abaixo do limite de detecção do teste (uma célula infectada em 10.000 células). Nestes testes, a enzima *Bst Large Fragment* possibilitou a obtenção de um número ligeiramente maior de resultados positivos. A reação contendo a DNA polimerase *Bst Large Fragment* apresentou maior sensibilidade (93,6%) que o teste com a *Bst 2.0 WarmStart* (87,1%), contrariando as informações do fabricante, que informa desempenho superior da enzima de nova geração. Contudo, a eficiência de LAMP não depende somente da capacidade de síntese da DNA polimerase, mas também da performance dos iniciadores. Com isso, para manter a coerência no preparo das reações de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2, foi dispensada a comparação entre as enzimas *Bst Large Fragment* e *Bst 2.0 WarmStart* no teste de LAMP para HTLV-2, e mantido, portanto, o protocolo de LAMP previamente estabelecido.

A partir disto, amostras provenientes do IAL foram testadas pela técnica de LAMP utilizando-se iniciadores previamente descritos (GOMES, YAGO, 2017). Para um melhor entendimento das análises de acurácia e do índice de concordância, as amostras também foram divididas de acordo com os resultados para HTLV-1 e HTLV-2. Conforme esperado, a acurácia de LAMP se mostrou baixa em comparação com métodos sorológicos, como já demonstrado para a PCR-RFLP e a qPCR. A acurácia do teste de LAMP para HTLV-1 no grupo de indivíduos em TARV (grupo G1) apresentou uma grande diferença com o grupo sem tratamento (grupo G2), o que não se observou no teste de LAMP para o HTLV-2. A avaliação de amostras com resultados discordantes entre LAMP e outras técnicas moleculares identificou cinco

amostras naqueles que não fazem uso de TARV, enquanto nos que fazem foram detectados 16 resultados discordantes com a qPCR e 17 na comparação com a PCR-RFLP.

A partir desta análise, foi identificado que o teste de LAMP para HTLV-1 necessitava de ajustes. Possivelmente, a baixa performance deste teste estava associada à capacidade de ligação dos iniciadores às sequências-alvo. A partir de dados de estudo prévio realizado por nosso grupo com pacientes do INI (GOMES, YAGO, 2017), em que foram identificados genótipos de HTLV-1aA, foi observado que na região do terminal 3' do iniciador externo F3 estava presente um polimorfismo de alta frequência (C7401T, em 88,75% das amostras) (Figura Suplementar 1). O terminal 3' de iniciadores é responsável por conferir especificidade, uma vez que variações nesta região podem inibir a síntese de uma nova fita pela DNA polimerase devido à falta de complementariedade com a fita-molde. MEAGHER et al. (2018) descreveram que a formação de dímeros e de estruturas de *hairpin* nos iniciadores pode ter grande participação no baixo desempenho de LAMP. Estas estruturas são formadas quando iniciadores se ligam entre si, permitindo a amplificação de suas próprias sequências (dímeros), ou após se dobrarem sobre sua própria estrutura, estabelecendo uma auto-hibridização, dando origem ao *hairpin*, que pode ocorrer principalmente em iniciadores longos, tais como FIP e BIP. Estes fenômenos consomem reagentes da mistura de reação e prejudicam seu funcionamento.

Portanto, no desenho de novos iniciadores de LAMP para HTLV-1, foi selecionada uma região do gene *tax* com baixa frequência de polimorfismos e com baixa identidade genética com HTLV-2. O conjunto escolhido neste estudo foi selecionado dentre outros levando em consideração diversos parâmetros além dos calculados pelo programa PrimerExplorer V5, como a formação de estruturas de *hairpin* e dímeros, diferentemente do conjunto descrito previamente. Contudo, na região de ligação de LF foi observada frequência de um polimorfismo em 97% da coorte do INI (Figura Suplementar 2), porém, localizado fora dos terminais 5' e 3'. Ao contrário do iniciador F3, cuja função é crítica na iniciação da etapa cíclica de LAMP, o iniciador LF é dispensável, pois os iniciadores de alça (LF e LB) atuam na aceleração da reação, gerando resultados positivos em menor intervalo de tempo (PARIDA et al., 2008).

Para dar início à avaliação dos novos iniciadores de LAMP para HTLV-1, foi necessário novo ajuste das concentrações de magnésio e betaína. A variação da concentração de magnésio não resultou em alteração na performance de LAMP, enquanto o aumento da concentração de betaína de 0,8 M para 1,0 M melhor a capacidade de detecção do teste. Foi notado, ainda, em todas as concentrações de betaína utilizadas, a amplificação de uma amostra que não havia sido positiva quando testada com os iniciadores estabelecidos previamente.

Devido ao volume escasso, as amostras provenientes do IAL foram submetidas a apenas mais um ensaio de LAMP para HTLV-1 com os novos iniciadores desenhados neste estudo. A partir disso, amostras previamente negativas se mostraram positivas. Portanto, a implementação destes iniciadores resultou em uma melhora relevante da acurácia de LAMP para HTLV-1 em relação aos resultados anteriores, o que também elevou a acurácia do teste considerando ambos os vírus. Além disso, o coeficiente de concordância entre os testes confirmatórios realizados pelo IAL e o teste de LAMP para HTLV-1, ou para HTLV-1 e 2, considerando-se os resultados com os novos iniciadores, se mostrou superior ao calculado com a reação antiga. Contudo, no alinhamento das sequências dos iniciadores com os genótipos HTLV-1b (África) e HTLV-1c (Melanésia), foram identificados sítios de polimorfismo genético, incluindo um na região 3' do iniciador B3 (Figura Suplementar 2). Portanto, a eficácia desses iniciadores em infecções por HTLV-1 de outros genótipos ainda precisa ser avaliada.

Devido à amostra utilizada no estudo apresentar tamanho diferente do estudo original de CAMPOS et al. (2017), foi recalculada a acurácia e sensibilidade de todos os testes realizados no IAL na identificação de casos de infecção por HTLV-1 e HTLV-2. Como observado por CAMPOS et al. (2017), o conjunto de testes sorológicos foi capaz de confirmar a quase totalidade de casos, compondo majoritariamente o diagnóstico definitivo. Contudo, 15% (12/82) das amostras analisadas por WB apresentaram resultado indeterminado, dos quais 50% (6/12) foram positivos nos testes de LAMP (cinco para HTLV-2 e um HTLV-1). Este resultado corrobora com o relato de SOLDAN et al. (1999), que também observaram que metade das amostras com resultado indeterminado no WB (4/8) é positiva pela técnica de PCR. É possível que esse efeito esteja associado à baixa estimulação antigênica devido à carga proviral reduzida em decorrência de provírus defectivos (KURAMITSU et al., 2017). Além disso, outro fator que pode promover este fenômeno é o período de soroconversão destes indivíduos (CAMPOS, 2016). Estudos em que foi realizado o acompanhamento sorológico e molecular de indivíduos com resultados indeterminados no diagnóstico de infecção por HTLV (GLOWACKA et al., 2013; MARTINS et al., 2010) demonstraram que a soroconversão, em alguns casos, pode demorar quatro anos, em média (MARTINS et al., 2010), podendo ser agravado naqueles indivíduos que fazem uso de imunossupressores. Integrando este raciocínio, um estudo realizado em modelo animal infectado com STLV, integrante do grande grupo PTLV (Vírus linfotrópicos para células T de primatas), do qual o HTLV pertence, associou a presença de polimorfismos nos genes *pol* e *rex* com a soroconversão tardia (DUBE et al., 2013). Portanto,

o uso de testes moleculares preenche as limitações de testes sorológicos, aprimorando assim o algoritmo de diagnóstico das infecções por HTLV-1/2.

Na comparação individualizada de testes moleculares com os resultados do diagnóstico definitivo, o teste de LAMP apresentou resultados semelhante aos demais métodos moleculares (qPCR e PCR-RFLP). De modo geral, os testes de LAMP para HTLV-1 e 2 apresentaram taxas de acurácia e sensibilidade similares à qPCR e à PCR-RFLP. No entanto, em indivíduos coinfectados por HIV que fazem uso de TARV, em que o diagnóstico molecular é difícil, a acurácia e sensibilidade dos testes de LAMP foram ligeiramente superiores, enquanto em indivíduos sem uso de TARV, o teste de LAMP apresentou performance ligeiramente inferior. Contudo, na PCR-RFLP, vale destacar que foram obtidos dois resultados falsos-positivos para HTLV-1. Conforme discutido por CAMPOS et al. (2017), mutações na sequência do gene *tax* destas amostras podem ter alterado o sítio de restrição da endonuclease *TaqI* α , impedindo que a enzima realizasse a digestão do amplicon, levando à classificação equivocada do tipo viral.

As amostras provenientes do IAL não haviam sido submetidas à quantificação de DNA por espectrofotometria ou outro método. Contudo, CAMPOS et al. (2017) apresentaram os valores de Ct da qPCR para os genes da albumina humana e *pol* de HTLV-1 e 2. Há uma relação diretamente inversa entre o Ct e o número de cópias de uma sequência alvo presente na reação de PCR. Desta forma, foi possível calcular o delta delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), que permite analisar de forma relativa a carga proviral presente na amostra. Como esperado, esta análise mostrou que no teste de LAMP para HTLV-2, o número de cópias do provírus nas amostras impactou a obtenção de resultados positivos, pois amostras com resultado positivo possuíam carga proviral relativa mais elevada. No teste de LAMP para HTLV-1, este fato parece não ter sido relevante para as diferenças entre os testes moleculares quanto ao número de amostras que retornaram resultados positivos. Desta forma, é possível que o teste de LAMP para HTLV-1, a qPCR e a PCR-RFLP realizadas no IAL apresentam limites de detecção semelhantes.

O teste de LAMP também foi testado em amostras de pacientes da coorte acompanhada pelo LAPCLIN-NEURO, do INI/FIOCRUZ, com o intuito de avaliar sua acurácia e sensibilidade em indivíduos que não apresentam a coinfeção com HIV. Apesar desta técnica ter obtido taxas de acurácia elevadas na comparação com outras metodologias, o índice de concordância *Kappa* apresentou resultados controversos, como por exemplo, o valor de -0,04 na comparação com a PCR-RFLP em amostras de HTLV-1, apesar da taxa de 89,60% de observações concordantes. Dessa forma, embora o índice *Kappa* de Cohen tenha indicado uma concordância insignificante entre os testes, tal cálculo considera a concordância obtida em

relação à esperada pelo acaso. Estes achados são explicados por contagens baixas ou nulas no grupo de verdadeiros negativos, o que é esperado na realização de testes para confirmação diagnóstica após triagem. Portanto, seria necessário um tamanho amostral elevado para a obtenção de resultados mais fidedignos.

O teste de LAMP para HTLV-1 e 2 apresentou melhor desempenho na população mono infectada por estes vírus do que em indivíduos co infectados por HIV, sugerindo que a co infecção com HIV afeta o diagnóstico molecular por LAMP. Este resultado, além do pior desempenho no diagnóstico de indivíduos que fazem o uso de TARV corroboram com relatos da literatura (COSTA, 2010; COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAUJO, 2011). CAMPOS et al. (2017) também obtiveram performance inferior dos testes moleculares em pacientes que faziam o uso de TARV, e sugeriram uma possível flutuação da carga proviral de HTLV-1/2 em decorrência da TARV, uma vez que se observa uma diminuição do número de células infectadas por HTLV-1/2 após um ano de terapia contínua (MACHUCA; SORIANO, 2000). Soma-se a isso o fato da TARV possivelmente selecionar populações de células T CD4 carreando provírus defectivos, o que dificultaria a ligação dos iniciadores de testes moleculares às suas regiões complementares no provírus (ABRAMS; AKAHATA; JACOBSON, 2011; BERINI et al., 2006; CAMPOS; GONÇALVES; CATERINO-DE-ARAUJO, 2017; CÁNEPA et al., 2015).

As taxas de sensibilidade do teste de LAMP para HTLV-1 indicam que este apresentou melhor desempenho que o teste para HTLV-2. Deste modo, os baixos níveis de carga proviral comumente associados à infecção por HTLV-2 em comparação com HTLV-1, como observado por nosso grupo (GOMES, YAGO, 2017) e por outros autores (LEE et al., 2004; MURPHY et al., 2004), podem explicar tal diferença. Outra possibilidade seria a realização de ajustes nos iniciadores para HTLV-2, como na reação de LAMP para HTLV-1. Diferente desse último, ainda não estavam disponíveis sequências provirais da coorte do INI quando foram desenhados os iniciadores para HTLV-2, e, por isso, a referência utilizada foi o genótipo Mo (HTLV-2a). Este genótipo apresenta uma identidade maior com o circulante no Brasil (HTLV-2c) do que com os demais, contudo há um polimorfismo no terceiro nucleotídeo do terminal 3' do B3 (presente em 100% das nossas amostras) (Figura Suplementar 3), que possivelmente afetou a performance do teste (GOMES, YAGO, 2017). Além disso, alterações como a inclusão de um segmento de quatro timinas na confecção FIP e BIP, que atuam na formação das alças nas extremidades 5' e 3', facilitariam a formação da estrutura em halter, que constitui a base de amplificação de LAMP na fase cíclica (PARIDA et al. 2008). A realização desta avaliação em estudo futuro com amostras da coorte do INI, devido ao esgotamento daquelas fornecidas pelo

IAL, permitirá melhorar a performance do teste de LAMP para HTLV-2 e diminuir o número de resultados falsos-negativos.

Algumas estratégias para detecção molecular de agentes etiológicos fazem uso de etapas de enriquecimento de DNA ou RNA com o intuito de aumentar a sensibilidade dos testes, como já descrito para retrovírus, inclusive para HTLV-1. Neste procedimento, o material genético retroviral é concentrado por meio de sonda, o que aumenta significativamente a sensibilidade pois diminui a quantidade de DNA necessário para tornar o teste positivo (MIYAZATO et al., 2016; TANO et al., 1995). No entanto, este processo acarretaria o aumento do custo e do tempo de realização da técnica, de forma que o custo-benefício seria prejudicado.

Apesar de não demonstrado neste estudo, a reação de LAMP pode ser revelada com a utilização de corantes fluorescentes, como: SYTO 9, SYTO 13, SYTO 16 (Invitrogen) (QUYEN et al., 2019), ou SYBR Green I (Thermo Fisher). Desta forma, foi realizado o cálculo do custo de LAMP com a revelação por adição de corante SYBR Green I ao final da reação. Deste modo, com a análise do custo-benefício dos algoritmos de confirmação calculada a partir das amostras do IAL (n=82), foi possível comparar diferentes técnicas entre si.

Como esperado, a aplicação de técnicas moleculares em etapa anterior às sorológicas representou uma redução de 40 a 63% do custo de confirmação. Contudo, apesar da combinação de menor custo ser a dos testes de LAMP e WB, a sensibilidade das técnicas deve ser um fator a ser considerado (Tabela Suplementar 3). Desta forma, o teste de INNO-LIA em substituição ao de WB na combinação com técnicas moleculares apresentou melhor performance, como também mostrado em outros estudos (CAMPOS et al., 2017, 2019; CAMPOS; GONÇALVES; CATERINO-DE-ARAÚJO, 2017), pois no algoritmo alternativo apresentou menos desfechos negativos e/ou indeterminados. Individualmente, a sensibilidade de LAMP foi menor que a da PCR-RFLP, de respectivamente 63,64% e 68,42%. Porém, quando comparado o desfecho entre essas duas técnicas somadas ao INNO-LIA, a combinação com a PCR-RFLP identificou apenas uma amostra a mais do que a associação com LAMP (Tabela Suplementar 1, ID 102). Somando a isso o fato de não haver diferença relevante no custo total (R\$ 6.131,88 para LAMP + INNO-LIA e R\$ 6.264,03 para PCR-RFLP + INNO-LIA), esses dois algoritmos apresentaram o melhor custo-benefício no que diz respeito apenas ao valor e cobertura das técnicas.

O teste de INNO-LIA, além do alto custo, apresenta grande complexidade na interpretação de resultados. Por sua vez, o teste de WB, que também possui alto custo, apresenta problemas com a frequência de resultados indeterminados, especialmente no diagnóstico de HTLV-2, sendo por isso necessário o uso de métodos moleculares de forma complementar. Por

isso, cabe aos laboratórios decidir qual a metodologia mais adequada para o diagnóstico confirmatório. Dois fatores importantes para a escolha do método a ser usado são a estrutura laboratorial e o tempo de execução. A qPCR é um teste de rápida resposta, contudo, necessita de alto investimento na compra de equipamento termociclador com sistema ótico para a detecção de amplificação em tempo real. Em contrapartida, a PCR-RFLP é uma técnica realizada em termociclador convencional, portanto, de menor custo, o que reduz o valor do investimento inicial em relação à qPCR. No entanto, a PCR-RFLP é executada em três etapas: (1) amplificação, (2) digestão das amostras positivas com endonucleases, e (3) eletroforese em gel de agarose para revelação do resultado. Além disso, a execução de todas as etapas da PCR-RFLP requer áreas separadas para a manipulação do DNA antes e após a amplificação.

Diferente dos métodos moleculares, os testes de INNO-LIA e WB são comercializados e, portanto, detêm metodologia padronizada. Geralmente, as diferentes variantes da PCR são estabelecidas internamente pelos laboratórios e, por isso, podem apresentar diferenças, como a DNA polimerase utilizada ou as sequências dos iniciadores de acordo com o alvo escolhido no genoma viral, o que pode resultar em custo e taxas de sensibilidade e especificidade distintas entre os testes utilizados por diferentes laboratórios.

Contudo, uma das limitações de nosso estudo foi a impossibilidade de definição da taxa de especificidade dos testes de LAMP para HTLV-1/2. A especificidade de um teste é calculada pela proporção de resultados negativos do teste dentro da população negativa. Dessa forma, a presença de resultados falso-positivos reduz a especificidade do teste. Contudo, a triagem inicial por ELISA elimina a grande maioria dos indivíduos com resultado negativo, o que aumenta a prevalência de resultados positivos. Além disso, a utilização do somatório de testes sorológicos (WB e INNO-LIA) e moleculares (qPCR e PCR-RFLP) como padrão-ouro reduz drasticamente a quantidade de indivíduos sem definição precisa do diagnóstico. Por isso, devido ao desenho do estudo, que resultou na ausência de resultados falso-positivos, não foi possível calcular as taxas de especificidade de LAMP.

De modo geral, o teste de LAMP se mostra vantajoso, pois permite a amplificação de DNA em termociclador convencional, ou em equipamentos mais simples, como o termobloco ou banho-maria. Além disso, a adição de corantes de DNA à reação permite a revelação do teste sem a necessidade de abertura do tubo de reação, necessitando apenas de exposição à luz azul, reduzindo assim as chances de contaminação. Portanto, demonstramos que o teste de LAMP desenvolvido por nosso grupo de pesquisa apresentou performance semelhante a outros testes moleculares, sugerindo que pode ser implementada em substituição à qPCR e à PCR-RFLP, e

complementar a rotina diagnóstica com testes sorológicos. Além disso, a transformação do teste de LAMP em um produto poderá resultar em um teste padronizado e melhorar o custo-benefício do algoritmo de diagnóstico das infecções por HTLV-1/2.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, podemos concluir que:

- A DNA polimerase *Bst Large Fragment* apresentou melhor desempenho que a *Bst 2.0 WarmStart* com os iniciadores desenhados neste estudo, particularmente para HTLV-1.
- Os testes de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2 mostraram boa acurácia na comparação dos resultados de testes moleculares com referência, tanto na população de indivíduos monoinfectados quanto na de pacientes coinfectados com HIV.
- Em relação ao diagnóstico final, as taxas de sensibilidade dos testes de LAMP para HTLV-1 e 2 foram semelhantes às dos testes moleculares em pacientes coinfectados por HIV.
- Em pacientes monoinfectados por HTLV-1/2, na comparação com o diagnóstico definitivo, o teste de LAMP para HTLV-2 apresentou sensibilidade superior à qPCR e à PCR-RFLP, enquanto o teste para HTLV-1 se mostrou superior somente à qPCR.
- Como observados para as demais técnicas moleculares, os testes de LAMP apresentaram taxas de sensibilidade inferiores às técnicas sorológicas de WB e INNO-LIA.
- O teste de LAMP desenvolvido por nosso grupo de pesquisa e avaliado nesse estudo pode ser usado como uma alternativa no diagnóstico confirmatório das infecções por HTLV-1/2 em substituição à qPCR e a PCR-RFLP.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, A.; AKAHATA, Y.; JACOBSON, S. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1320–1331, ago. 2011.
- AIDS: proposed WHO criteria for interpreting western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 69, n. 1, p. 127–133, 1991.
- ARAUJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T. The HTLV-1 neurological complex. **The Lancet. Neurology**, v. 5, n. 12, p. 1068–1076, dez. 2006.
- AZRAN, I.; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY, Y.; ABOUD, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology**, v. 1, p. 20, ago. 2004.
- BECHERER, L. et al. Simplified Real-Time Multiplex Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Novel Mediator Displacement Probes with Universal Reporters. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 7, p. 4741–4748, abr. 2018.
- BEILKE, M. A. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. **AIDS research and human retroviruses**, v. 28, n. 2, p. 139–147, fev. 2012.
- BERINI, C. A. et al. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 1, p. 69–73, 2006.
- BOXUS, M. et al. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, p. 76, ago. 2008.
- CALATTINI, S. et al. New Strain of Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Type 3 in a Pygmy from Cameroon with Peculiar HTLV Serologic Results. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 561–564, fev. 2009.
- CAMPOS, K. R. et al. Line Immunoassay for Confirmation and Discrimination of Human T-Cell Lymphotropic Virus Infections in Inconclusive Western Blot Serum Samples from Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 1, dez. 2019.
- CAMPOS, K. R.; CATERINO-DE-ARAUJO. **Desafios no diagnóstico da infecção pelos Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas do tipo 1 e tipo 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em pacientes infectados com o HIV-1**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças) - Instituto Aldolfo Lutz, São Paulo, 2016
- CAMPOS, K. R.; GONÇALVES, M. G.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Short Communication: Failures in Detecting HTLV-1 and HTLV-2 in Patients Infected with HIV-1. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 4, p. 382–385, abr. 2017.
- CÁNEPA, C. et al. Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 5643–5658, out. 2015.

CASSAR, O.; GESSAIN, A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. In: CASOLI, C. (Ed.). **Human T-Lymphotropic Viruses**. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1582p. 3–24, mar. 2017.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. DE F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 926–931, jun. 2005.

CATERINO-DE-ARAÚJO, A. et al. Sensitivity of Two Enzyme-linked Immunosorbent Assay Tests in Relation to Western Blot in Detecting Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II Infection among HIV-1 Infected Patients from São Paulo, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, n. 3, p. 173–182, mar. 1998.

CATERINO-DE-ARAÚJO, A. et al. Short Communication: Current Prevalence and Risk Factors Associated with Human T Lymphotropic Virus Type 1 and Human T Lymphotropic Virus Type 2 Infections Among HIV/AIDS Patients in São Paulo, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 31, n. 5, p. 543–549, maio 2015.

COSTA, E. A. S. **Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2**. [s.l.] São Paulo (Estado). Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Programa de Pós-Graduação em Ciências, 2010.

COSTA, E. A. S.; MAGRI, M. C.; CATERINO-DE-ARAÚJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 173, n. 2, p. 280–286, maio 2011.

CURIS, C. et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Induced Overexpression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Facilitates Trafficking of Infected Lymphocytes through the Blood-Brain Barrier. **Journal of Virology**, v. 90, n. 16, p. 7303–7312, jul. 2016.

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 34, n. 5, p. 527–531, dez. 2003.

DUBE, S. et al. Delayed seroconversion to HTLV-1 infection is associated with mutations in the pol and rex genes. **Virology Journal**, v. 10, p. 282, set. 2013.

EIRAKU, N. et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. **Journal of Virology**, v. 70, n. 3, p. 1481–1492, mar. 1996.

FILIPPONE, C. et al. A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1663–1672, maio 2012.

FURUKAWA, Y. et al. Phylogenetic Subgroups of Human T Cell Lymphotropic Virus (HTLV) Type I in the tax Gene and Their Association with Different Risks for HTLV-I–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. p. 7, nov. 2000.

GALLO, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5926–5930, set. 2005.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, nov. 2012.

GLOWACKA, I. et al. Delayed seroconversion and rapid onset of lymphoproliferative disease after transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 from a multiorgan donor. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 57, n. 10, p. 1417–1424, nov. 2013.

GOMES, YAGO. **Estabelecimento de metodologia de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediado por alça (LAMP) para o diagnóstico confirmatório das infecções pelos vírus linfotrópicos para células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1/2)**. 2017. Monografia - Faculdade de Biomedicina, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

GRAKOU, A. et al. Pillars article: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999. 285: 221-227. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 194, n. 9, p. 4066–4072, maio 2015.

HALL, W. W. et al. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology: Official Publication of the International Retrovirology Association**, v. 13 Suppl 1, p. S204-214, dec. 1996.

HANAOKA, M.; KUBO, T.; SAITOH, A. Discrepancy between human T-cell lymphotropic virus type I screening test and confirmatory tests in non-endemic areas: Discrepancy of HTLV-1 test. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 38, n. 5, p. 793–796, maio 2012.

HENKE, W. et al. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 19, p. 3957–3958, out. 1997.

HJELLE, B. et al. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet (London, England)**, v. 339, n. 8794, p. 645–646, mar. 1992.

HLEIHEL, R. et al. The HTLV-1 oncoprotein Tax is modified by the ubiquitin related modifier 1 (Urm1). **Retrovirology**, v. 15, abr. 2018.

HLELA, C. et al. The Prevalence of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 in the General Population is Unknown. **AIDS Reviews**, p. 10, out. 2009.

IGAKURA, T. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1713–1716, mar. 2003.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

JACOB, F. et al. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 42, n. 2, p. 149–155, jun. 2008.

JENKINS, M. R. et al. The Strength of T Cell Receptor Signal Controls the Polarization of Cytotoxic Machinery to the Immunological Synapse. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 621–631, out. 2009.

KANNIAN, P.; GREEN, P. L. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. **Viruses**, v. 2, n. 9, p. 2037–2077, set. 2010.

KASHIMA, S. et al. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. **AIDS research and human retroviruses**, v. 22, n. 10, p. 953–959, out. 2006.

KHABBAZ, R. F. et al. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 6, p. 375–380, fev. 1992.

KURAMITSU, M. et al. Proviral Features of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 in Carriers with Indeterminate Western Blot Analysis Results. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 2838–2849, jul. 2017.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, mar. 1977.

LEE, T.-H. et al. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 31, n. 4, p. 275–282, dez. 2004.

LIU, H.-F. et al. The three human T-lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 2, p. 359–368, fev. 1996.

LIU, Z.; DONG, Z.; LIU, D. Development of a rapid assay to detect the jellyfish *Cyanea nozakii* using a loop-mediated isothermal amplification method. **Mitochondrial DNA**, p. 1–5, mar. 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MA, C. et al. Accelerated isothermal nucleic acid amplification in betaine-free reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 530, p. 1–4, ago. 2017.

MACHUCA, A.; SORIANO, V. In Vivo Fluctuation of HTLV-I and HTLV-II Proviral Load in Patients Receiving Antiretroviral Drugs. **J AIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 24, n. 2, p. 189–193, jun. 2000.

- MAGRI, M. C. et al. Tax Gene Characterization of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Strains from Brazilian HIV-Coinfected Patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 12, p. 1775–1778, dez. 2012.
- MAHIEUX, R. et al. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Gag Indeterminate Western Blot Patterns in Central Africa: Relationship to Plasmodium falciparum Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4049–4057, nov. 2000.
- MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1074–1090, jul. 2011.
- MARTINS, M. L. et al. Long-term serological follow-up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 10, p. 1746–1753, out. 2010.
- MAUCLÈRE, P. et al. HTLV-2B Strains, Similar to Those Found in Several Amerindian Tribes, Are Endemic in Central African Bakola Pygmies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 9, p. 1316–1323, maio 2011.
- MEAGHER, R. J. et al. Impact of Primer Dimers and Self-Amplifying Hairpins on Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection of Viral RNA. **The Analyst**, v. 143, n. 8, p. 1924–1933, abr. 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV. 2003.
- MIURA, T. et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 3, p. 1124–1127, fev. 1994.
- MIYAZATO, P. et al. Application of targeted enrichment to next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. **Scientific Reports**, v. 6, jun. 2016.
- MORIMOTO, H. K. et al. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 225–230, ago. 2007.
- MURPHY, E. L. et al. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. **Neurology**, v. 48, n. 2, p. 315–320, fev. 1997.
- MURPHY, E. L. et al. Higher Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Provirus Load Is Associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II Subtype A versus B, and with Male Sex and a History of Blood Transfusion. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 3, p. 504–510, ago. 2004.
- NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 3, p. 223–229, jun. 2002.

NEJMEDDINE, M. et al. Human T-lymphotropic Virus, Type 1, Tax Protein Triggers Microtubule Reorientation in the Virological Synapse. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 33, p. 29653–29660, ago. 2005.

NEUVEUT, C.; JEANG, K. T. HTLV-I Tax and cell cycle progression. **Progress in Cell Cycle Research**, v. 4, p. 157–162, 2000.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. E63, jun. 2000.

NOVOA, P. et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. **Journal of Medical Virology**, v. 79, n. 2, p. 182–187, fev. 2007.

OLAH, I. et al. Neither molecular diversity of the envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 5, p. 837–842, maio 2010.

PAIVA, A. et al. ORIGIN AND PREVALENCE OF HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1 (HTLV-1) AND TYPE 2 (HTLV-2) AMONG INDIGENOUS POPULATIONS IN THE AMERICAS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 1, p. 01–14, fev. 2015.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 265–274, jun. 2014.

PARIDA, M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 6, p. 407–421, nov. 2008.

QUYEN, T. L. et al. Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2234, out. 2019.

ROMANELLI, M. G. et al. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, set. 2013.

SAGGIORO, D. Anti-Apoptotic Effect of Tax: An NF- κ B Path or a CREB Way? **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1001–1014, jun. 2011.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12, p. 3618–3622, jun. 1983.

SILVA, E. A. et al. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 66, n. 2, p. 253–257, fev. 2002.

SILVA, M. C. et al. HCV/HTLV coinfection: Does HTLV-1 interfere in the natural history of HCV-related diseases? **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 11, p. 1967–1972, abr. 2016.

SILVA, M. T. Neurological Aspects of HIV/Human T Lymphotropic Virus Coinfection. **AIDS Reviews.**, p. 8, jun. 2009.

SILVA, M. T. T. et al. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Proviral Load in Asymptomatic Carriers, HTLV-1–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis, and Other Neurological Abnormalities Associated with HTLV-1 Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 5, p. 689–692, mar. 2007.

SOLDAN, S. S. et al. HTLV-I/II seroindeterminate Western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 3, p. 685–694, set. 1999.

TANNER, N. A.; ZHANG, Y.; EVANS, T. C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. **BioTechniques**, v. 58, n. 2, fev. 2015.

TANO, H. et al. Prior enrichment of human immunodeficiency virus DNA with probe DNA particles for efficient PCR diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2489–2491, set. 1995.

THORSTENSSON, R.; ALBERT, J.; ANDERSSON, S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. **Transfusion**, v. 42, n. 6, p. 780–791, jun. 2002.

VANDAMME, A.-M. et al. African Origin of Human T-Lymphotropic Virus Type 2 (HTLV-2) Supported by a Potential New HTLV-2d Subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 4327–4340, maio 1998.

WANG, X. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 238, p. 86–93, dez. 2016.

WATERS, A. et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 52, n. 1, p. 38–44, set. 2011.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 22, p. 7994–7999, maio 2005.

WU, K. et al. Protein Profile of Tax-associated Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 495–508, jan. 2004.

YAO, K. et al. Human T lymphotropic virus types I and II western blot seroindeterminate status and its association with exposure to prototype HTLV-I. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 3, p. 427–437, fev. 2006.

ZANELLA, L. et al. Genome-wide analyses of HTLV-1aD strains from Cape Verde, Africa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 9, p. 594–596, set. 2016.

ZANJANI, D. S. et al. Molecular Analysis of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 and 2 (HTLV-1/2) Seroindefinite Blood Donors from Northeast Iran: Evidence of Proviral tax, env, and gag Sequences. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 27, n. 2, p. 131–135, out. 2010.

APÊNDICES

Tabela Suplementar 1 – Resultados de testes confirmatórios com amostras do IAL.

ID tubo	Grupo	ELISA - Final	WB	INNO-LIA	qPCR	PCR-RFLP	Resultado Final	LAMP
1	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
2	G1	HTLV	HTLV	HTLV	Neg	Neg	HTLV	Neg
3	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
4	G1	HTLV-1	HTLV	HTLV	Neg	HTLV-1	HTLV-1	Neg
5	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
6	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	Neg
7	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	Neg
8	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
9	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
10	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
11	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	Neg
12	G1	HTLV-2	IND	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-2	Neg
13	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
14	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
15	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1
16	G1	HTLV-1	HTLV	HTLV	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
17	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
18	G1	HTLV-2	HTLV	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
19	G1	HTLV-2	IND	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
20	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
21	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
22	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
23	G1	HTLV	HTLV	HTLV	Neg	Neg	HTLV	Neg
24	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1
25	G1	HTLV-2	HTLV	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-2	Neg
26	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	Neg
27	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
28	G1	HTLV-2	IND	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
29	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
30	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
31	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
32	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
33	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
34	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
35	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
36	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg
37	G1	HTLV-2	IND	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
38	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
39	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
40	G1	HTLV-2	IND	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
41	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
42	G1	HTLV-2	IND	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
43	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
44	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-1	HTLV-2	Neg
46	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1

Tabela Suplementar 1 (Continuação).

ID tubo	Grupo	ELISA - Final	WB	INNO-LIA	qPCR	PCR-RFLP	Resultado Final	LAMP
48	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-1	HTLV-2	Neg
49	G1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
50	G1	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-2	HTLV-2
66	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
67	G2	HTLV-2	HTLV-2	IND	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
68	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
71	G2	HTLV-2	IND	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
72	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg
74	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	Neg
76	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-2	Neg
79	G2	HTLV	IND	HTLV	Neg	Neg	HTLV	Neg
81	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
82	G2	HTLV-2	IND	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
83	G2	HTLV-2	IND	HTLV-2	Neg	HTLV-2	HTLV-2	Neg
84	G2	HTLV-1	IND	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
88	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
89	G2	HTLV-2	IND	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
90	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
91	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
93	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	HTLV-2	Neg
95	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
96	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
97	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
98	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
100	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	NR	HTLV-1	HTLV-1
101	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
102	G2	HTLV-2	Neg	IND	Neg	HTLV-2	HTLV-2	Neg
103	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
104	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	Neg
105	G2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
106	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
107	G2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2
112	G2	IND	rgp46-II e GD21	gp21-I/II	Neg	Neg	IND	Neg
114	G2	IND	rgp46-I e GD21	gp21-I/II	Neg	Neg	IND	Neg
115	G2	IND	p21 e p19	gp21-I/II	Neg	Neg	IND	Neg
116	G2	IND	p24	p19-I/II e gp21-I/II	Neg	Neg	IND	Neg
117	G2	IND	p24, GD21	gp21-I/II	Neg	Neg	IND	Neg
118	G1	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
119	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
120	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
121	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
122	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
123	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
124	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
125	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
126	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg
127	G2	Neg	-	-	-	-	Neg	Neg

Notas: IND, indeterminado; NR, não realizado.

Tabela suplementar 2 – Acurácia e sensibilidade de testes realizados pelo IAL.

Grupo	Vírus	Testes sorológicos				Testes moleculares				
		+	-	Acurácia	Sensibilidade	+	-	Acurácia	Sensibilidade	
Total	HTLV-1/2	+	76	1	98,78	98,70	61	16	80,49	79,22
		-	0	5			0	5		
	HTLV-1	+	39	0	100	100	35	4	92,68	89,74
		-	0	43			2	41		
	HTLV-2	+	34	1	98,78	97,14	25	10	87,80	71,43
		-	0	47			0	47		
G1	HTLV-1/2	+	48	0	100	100	36	12	75,00	75,00
		-	0	0			0	0		
	HTLV-1	+	25	2	95,83	92,59	24	3	93,75	88,89
		-	0	21			0	21		
	HTLV-2	+	19	0	100	100	11	8	83,33	57,89
		-	0	29			0	29		
G2	HTLV-1/2	+	28	1	97,06	96,55	25	4	88,24	86,21
		-	0	5			0	5		
	HTLV-1	+	12	0	100	100	11	1	97,06	91,67
		-	0	22			0	22		
	HTLV-2	+	15	1	97,06	93,75	14	2	94,12	87,50
		-	0	18			0	18		

Notas: Valores de acurácia e sensibilidade (%) calculados a partir de tabelas de contingência construídas com resultados de testes sorológicos (WB e INNO-LIA) e de testes moleculares (qPCR e PCR-RFLP) utilizando-se como referência o diagnóstico definitivo descrito por Campos et al. (2017). G1, pacientes coinfectados com HIV em uso de TARV (n=48). G2, pacientes coinfectados com HIV sem uso de TARV (n=34). Total de 82 amostras.

Tabela Suplementar 3 – Acurácia e sensibilidade de WB e INNO-LIA (IAL).

Grupo	Vírus	WB				INNO-LIA				
		+	-	Acurácia	Sensibilidade	+	-	Acurácia	Sensibilidade	
Total	HTLV-1/2	+	64	13	84,15	83,12	75	2	97,56	97,40
		-	0	5			0	5		
	HTLV-1	+	36	3	96,34	92,31	36	3	96,34	92,31
		-	0	43			0	43		
	HTLV-2	+	22	13	84,15	62,86	33	2	97,56	94,29
		-	0	47			0	47		
G1	HTLV-1/2	+	42	6	87,50	87,50	48	0	100	100
		-	0	0			0	0		
	HTLV-1	+	25	2	95,83	92,59	24	3	93,75	88,89
		-	0	21			0	21		
	HTLV-2	+	12	7	85,42	63,16	19	0	100	100
		-	0	29			0	29		
G2	HTLV-1/2	+	22	7	79,41	75,86	27	2	94,12	93,10
		-	0	5			0	5		
	HTLV-1	+	11	1	97,06	91,67	12	0	100	100
		-	0	22			0	22		
	HTLV-2	+	11	5	85,29	68,75	14	2	94,12	87,50
		-	0	18			0	18		

Notas: Valores de acurácia e sensibilidade (%) calculados a partir de tabelas de contingência construídas com resultados de testes de WB e INNO-LIA utilizando-se como referência o diagnóstico definitivo descrito por Campos et al. (2017). G1, pacientes coinfectados com HIV em uso de TARV (n=48). G2, pacientes coinfectados com HIV sem uso de TARV (n=34). Total de 82 amostras.

Tabela suplementar 4 – Acurácia e sensibilidade da qPCR e PCR-RFLP (IAL).

Grupo	Vírus	qPCR				PCR-RFLP				
		+	-	Acurácia	Sensibilidade	+	-	Acurácia	Sensibilidade	
Total	HTLV-1/2	+	51	26	68,29	66,23	52	24	70,37	68,42
		-	0	5			0	5		
	HTLV-1	+	29	10	87,80	74,39	31	7	88,89	81,58
		-	0	43			2	41		
	HTLV-2	+	22	13	84,15	62,86	19	16	80,25	54,29
		-	0	47			0	46		
G1	HTLV-1/2	+	28	20	58,33	58,33	30	18	62,50	62,50
		-	0	0			0	0		
	HTLV-1	+	18	9	81,25	66,67	21	6	83,33	77,78
		-	0	21			2	19		
	HTLV-2	+	10	9	81,25	52,63	7	12	75,00	36,84
		-	0	29			0	29		
G2	HTLV-1/2	+	23	6	82,35	79,31	22	6	81,82	78,50
		-	0	5			0	5		
	HTLV-1	+	11	1	97,06	91,67	10	1	96,97	90,91
		-	0	22			0	22		
	HTLV-2	+	12	4	88,24	75,00	12	4	87,88	75,00
		-	0	18			0	17		

Notas: Valores de acurácia e sensibilidade (%) calculados a partir de tabelas de contingência construídas com resultados de testes de qPCR e PCR-RFLP utilizando-se como referência o diagnóstico definitivo descrito por Campos et al. (2017). G1, pacientes coinfectados com HIV em uso de TARV (n=48). G2, pacientes coinfectados com HIV sem uso de TARV (n=34). Total de 82 amostras.

Tabela Suplementar 5 – Resultados de testes confirmatórios (INI/FIOCRUZ).

LPCN	WB	qPCR	PCR-RFLP	LAMP	Resultado Final	LPCN	WB	qPCR	PCR-RFLP	LAMP	Resultado Final
01	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	32	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
02	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	33	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
03	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	34	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
04	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	35	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
05	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	36	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
06	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	37	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
07	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	38	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
08	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	39	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
09	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	40	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
10	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	41	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
11	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	42	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
12	IND	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	43	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
13	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	44	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
14	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	45	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
15	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	46	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
16	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	47	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
17	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	48	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
18	IND	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	49	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
19	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	50	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
20	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	51	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
21	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	52	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
22	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	53	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
23	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	54	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
24	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	55	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
25	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	56	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
26	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	57	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
27	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	58	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
28	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	59	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
29	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	60	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
30	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	61	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
31	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	62	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1

Tabela Suplementar 5 (Continuação).

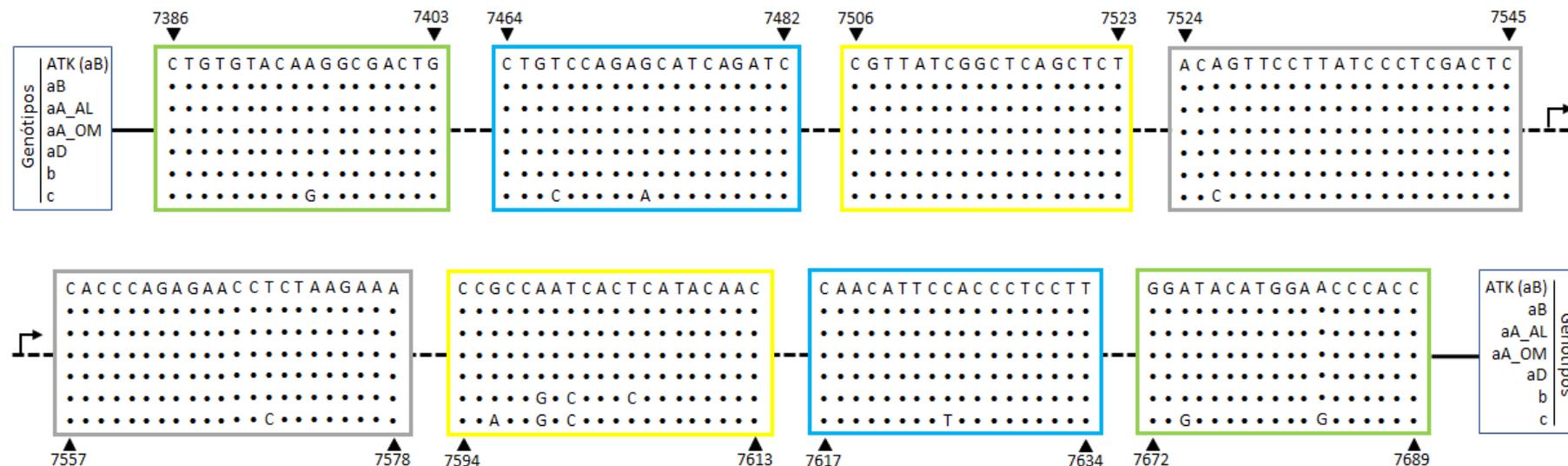
LPCN	WB	qPCR	PCR-RFLP	LAMP	Resultado Final	LPCN	WB	qPCR	PCR-RFLP	LAMP	Resultado Final
63	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	93	HTLV-2	Neg	Neg	Neg	HTLV-2
64	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	94	HTLV-2	Neg	Neg	Neg	HTLV-2
65	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	95	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	HTLV-2
66	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	96	HTLV-2	Neg	Neg	Neg	HTLV-2
67	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	97	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	HTLV-2
68	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	98	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
69	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	99	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
70	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	100	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
71	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	101	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
72	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	102	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
73	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	103	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
74	NR	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	104	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
75	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	105	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	HTLV-1
76	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	106	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
77	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	107	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
78	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	108	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	Neg	HTLV-1
79	HTLV-2	Neg	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	109	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
80	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	110	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
81	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	111	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
82	HTLV-2	Neg	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	112	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
83	HTLV-2	Neg	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	113	HTLV-1	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
84	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	114	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
85	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	115	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
86	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	116	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
87	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	117	IND	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1
88	NR	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	HTLV-2	118	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
89	HTLV-2	Neg	Neg	HTLV-2	HTLV-2	119	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	HTLV-1
90	NR	Neg	HTLV-2	Neg	HTLV-2	120	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
91	HTLV-2	Neg	HTLV-2	Neg	HTLV-2	121	HTLV-1	Neg	Neg	HTLV-1	HTLV-1
92	HTLV-2	Neg	Neg	Neg	HTLV-2	122	HTLV	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1

Tabela Suplementar 5 (Continuação).

LPCN	WB	qPCR	PCR-RFLP	LAMP	Resultado Final	LPCN	WB	qPCR	PCR-RFLP	LAMP	Resultado Final
123	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	134	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
124	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	135	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
125	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	136	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
126	HTLV-1+2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	137	HTLV-2	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
127	HTLV-1	Neg	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	138	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
128	IND	Neg	HTLV-1	Neg	HTLV-1	139	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
129	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	140	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
130	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	141	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
131	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	142	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
132	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	143	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1
133	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	144	HTLV	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1	HTLV-1

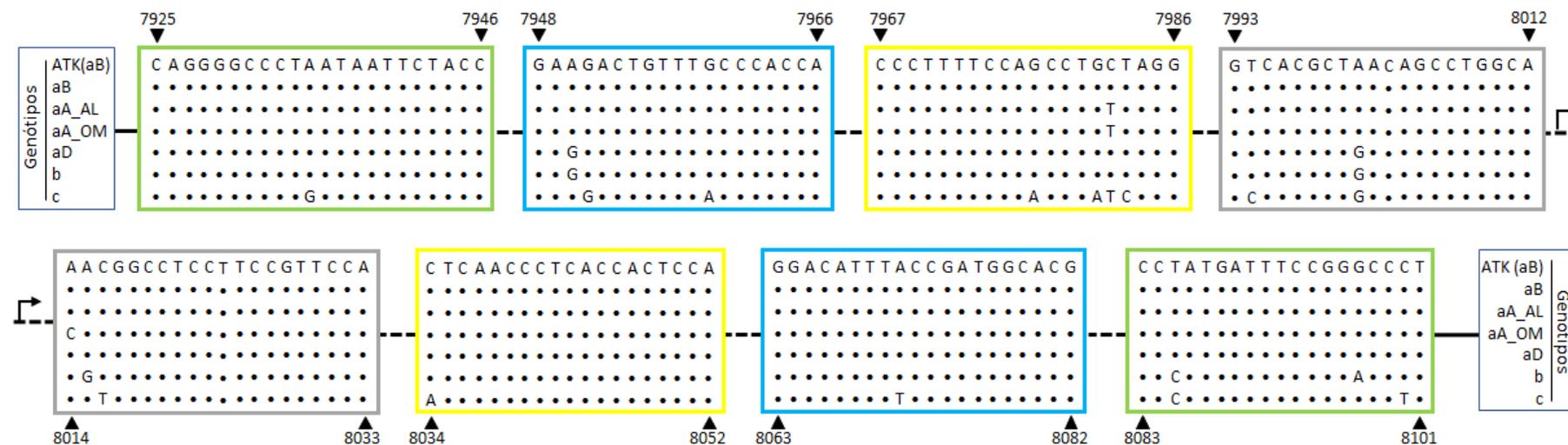
Notas: IND, indeterminado; NR, não realizado.

Figura Suplementar 1 – Polimorfismos nas regiões de *tax* de HTLV-1 correspondentes aos iniciadores de LAMP previamente descritos



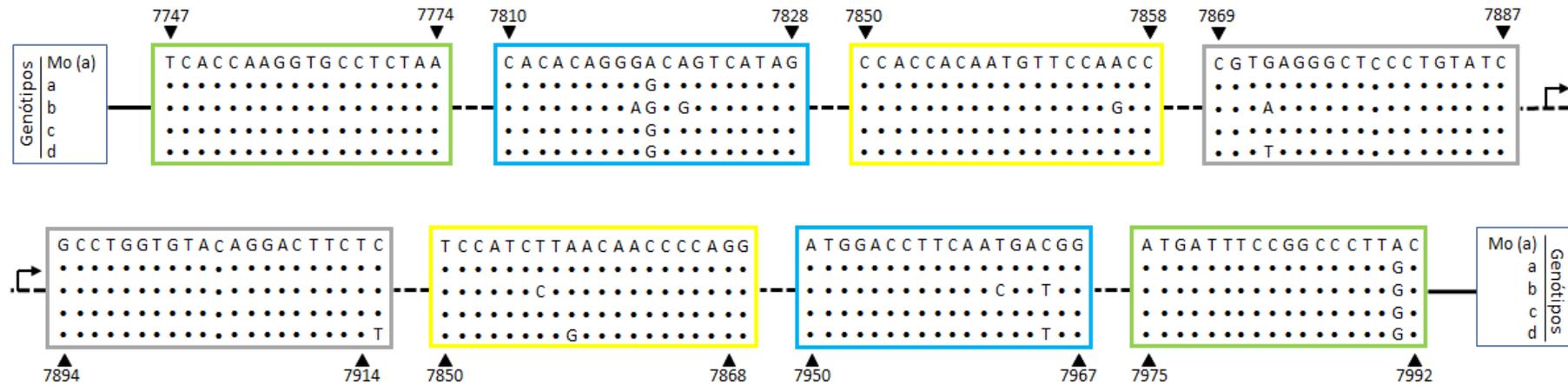
Legenda: Análise realizada com o programa BioEdit v7.2.5 comparando as regiões em *tax* de HTLV-1 onde ocorrem as hibridizações com os iniciadores. Foram considerados os seguintes genótipos determinados por análise filogenética da LTR: HTLV-1aB, Cosmopolita Japonês; HTLV-1aA_AL, Cosmopolita Transcontinental grupo América Latina; HTLV-1aA_OM, Cosmopolita Transcontinental grupo Oriente Médio; HTLV-1aD, Norte da África; HTLV-1b, África; e HTLV-1c, Melanésia. Foi utilizada a sequência ATK (HTLV-1aB), (GenBank J02029), como referência. As posições dos nucleotídeos são referentes ao genoma do protótipo, e estão indicadas por setas, e as regiões que correspondem aos sítios de hibridização dos iniciadores estão destacadas em: (i) verde: F3/B3; (ii) azul: F2/B2; (iii) cinza: F1c/B1c; e (iv) amarelo: LF/LB.

Figura Suplementar 2 – Polimorfismos nas regiões de tax de HTLV-1 correspondentes aos iniciadores de LAMP desenhados neste estudo.



Legenda: Análise realizada com o programa BioEdit v7.2.5 comparando as regiões em *tax* de HTLV-1 onde ocorrem as hibridizações com os iniciadores. Foram considerados os seguintes genótipos determinados por análise filogenética da LTR: HTLV-1aB, Cosmopolita Japonês; HTLV-1aA_AL, Cosmopolita Transcontinental grupo América Latina; HTLV-1aA_OM, Cosmopolita Transcontinental grupo Oriente Médio; HTLV-1aD, Norte da África; HTLV-1b, África; e HTLV-1c, Melanésia. Foi utilizada a sequência ATK (HTLV-1aB), (GenBank J02029), como referência. As posições dos nucleotídeos são referentes ao genoma do protótipo, e estão indicadas por setas, e as regiões que correspondem aos sítios de hibridização dos iniciadores estão destacadas em: (i) verde: F3/B3; (ii) azul: F2/B2; (iii) cinza: F1c/B1c; e (iv) amarelo: LF/LB.

Figura Suplementar 3 – Polimorfismos nas regiões de *tax* de HTLV-2 correspondentes aos iniciadores de LAMP previamente descritos.



Legenda: Análise realizada com o programa BioEdit v7.2.5 comparando as regiões em *tax* de HTLV-2 onde ocorrem as hibridizações com os iniciadores. Foram considerados os seguintes genótipos determinados por análise filogenética da LTR: HTLV-2a, predominante nos Estados Unidos, Europa e ameríndios do México e Brasil; HTLV-2b, Paleo-índiano; HTLV-2c, Caiapós; e HTLV-2d, pigmeu Efe do Congo. Foi utilizada a sequência Mo (HTLV-2a), GenBank M10060, como referência. As posições dos nucleotídeos que se referem ao genoma do protótipo estão indicadas por setas, e as regiões que correspondem aos sítios de hibridização dos iniciadores estão destacadas em: (i) verde: F3/B3; (ii) azul: F2/B2; (iii) cinza: F1c/B1c; e (iv) amarelo: LF/LB.

ANEXOS

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE LAMP PARA A CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO POR HTLV-1/2.

Pesquisador: Marcus Tullius Teixeira da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 98332818.9.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.065.937

Apresentação do Projeto:

Os vírus linfotrópicos para células T humanas (HTLV) constituem um grupo de quatro subtipos distintos de retrovírus: HTLV-1, 2, 3 e 4. No entanto, somente HTLV-1 e 2 apresentam relevância epidemiológica, e no Brasil observa-se prevalência média de 0,46% em doadores de sangue. Estes vírus infectam linfócitos T, e sua transmissão pode ocorrer por via vertical, predominantemente pelo aleitamento materno, ou por via horizontal, através de via sexual ou por transfusão de produtos sanguíneos contaminados. Conforme recomendação do Ministério da Saúde, o diagnóstico das infecções por HTLV-1/2 é realizado por triagem sorológica por ELISA, seguida de confirmação dos casos reativos pelos testes de Western blot (WB), imunofluorescência, ou reação em cadeia da polimerase (PCR). O teste de WB pode apresentar resultados indeterminados em 50-60% dos casos, principalmente em portadores de HTLV-2. No entanto, a técnica de WB ainda apresenta sensibilidade mais elevada que a PCR. Por outro lado, métodos moleculares apresentam alta especificidade, gerando resultados definitivos na detecção e subtipagem viral. Dessa forma, grupos de pesquisa têm sugerido uma atualização do algoritmo de diagnóstico confirmatório das infecções por HTLV-1/2, em que a utilização inicial de métodos moleculares possibilitaria a confirmação de um grande número de amostras, e somente casos com resultado negativo seriam submetidos ao WB. Em virtude disso, os testes de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) para HTLV-1 e 2, estabelecidos por nosso grupo de pesquisa, poderiam ser utilizados em laboratórios de rotina diagnóstica como uma alternativa à PCR convencional ou

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.065.937

em tempo real. Por isso, este projeto tem como objetivo determinar a acurácia dos testes de LAMP para HTLV-1/2 na confirmação das infecções por estes vírus. Para tal, serão utilizadas 92 amostras de DNA proviral obtidas de indivíduos com resultado reagente ou indeterminado na triagem sorológica de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 por ELISA, sendo que 77 apresentaram diagnóstico definitivo de infecção por HTLV-1 e/ou 2. A população de estudo foi previamente caracterizada no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e apresentam registros de resultados de: dois testes distintos de ELISA (Murex e Gold ELISA), WB, imunoenensaio em linha (INNO-LIA), PCR em tempo real, e nested-PCR com subtipagem viral pela técnica de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP). Dessa forma, esperamos demonstrar que os testes de LAMP para HTLV-1 e 2 possuem sensibilidade e especificidade comparáveis à PCR, e que representariam uma alternativa vantajosa, por apresentar custos reduzidos e requerer estrutura laboratorial simples em comparação à PCR em tempo real, e menor risco de ampliações inespecíficas e de tempo de execução em relação à PCR convencional.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

Determinar a acurácia do teste de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) na confirmação de infecção pelos vírus linfotrópicos para células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1/2).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a acurácia do teste de LAMP para HTLV-1/2, utilizando-se como referência o resultado final obtido com métodos confirmatórios sorológicos e moleculares.
- Determinar acurácia do teste de LAMP para HTLV-1/2, tendo-se como referência somente os resultados de métodos confirmatórios moleculares (nested-PCR-RFLP e qPCR).
- Determinar o nível de concordância do teste de LAMP para HTLV-1/2 com os diferentes métodos sorológicos e moleculares de diagnóstico confirmatório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos previstos, diretos ou indiretos, são mínimos. Não haverá riscos relacionados à coleta de amostras, pois serão utilizadas amostras derivadas de estudo anterior. Informações que possam identificar os sujeitos da pesquisa também não serão utilizadas, pois as amostras encontram-se codificadas. Além disso, somente serão utilizados dados de domínio público para a realização de análises de comparação entre os resultados dos diferentes métodos de diagnóstico avaliados.

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.065.937

Benefícios:

Não há benefícios diretos. Contudo, com a determinação da acurácia dos testes de LAMP, esta técnica representaria uma alternativa vantajosa, pois apresenta custos reduzidos e requer estrutura laboratorial mais simples em comparação com a PCR em tempo real, e menor risco de ampliações inespecíficas e de tempo de execução em relação à PCR convencional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto é um estudo de corte transversal para avaliação de método de diagnóstico, e será usada uma amostra de conveniência, composta de DNA proviral de HTLV-1/-2 obtida de indivíduos infectados, previamente identificados em uma coorte de portadores de infecção por HIV, em estudo realizado no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (CAMPOS et al, 2017). Amostras de sangue que apresentaram resultados reagentes ou indeterminados em pelo menos um de dois testes de ELISA (Murex e Gold ELISA), foram submetidas à confirmação sorológica pelos testes de WB, INNO-LIA, e molecular de qPCR, e nested-PCR/FLP (CAMPOS et al, 2017). Em 108 casos foram confirmadas infecção por HTLV-1 (n=56), HTLV-2 (n=45), coinfeção por HTLV-1 e HTLV-2 (n=1) e infecção por HTLV, sem definição do subtipo viral (n=6). Em nove amostras foi detectado padrão indeterminado à análise pelos testes sorológicos e estas resultaram negativas nos testes moleculares, e em dez amostras os quatro testes confirmatórios resultaram negativos. Os dados obtidos neste projeto serão comparados com os dados publicados por CAMPOS et al. (2017), e não será necessária a coleta de novos dados sócio demográficos e clínicos, ou outras informações que não sejam públicas. Teremos acesso apenas aos números de identificação das amostras (1 a 127). Há que se destacar que devido ao término ou volume insuficiente de DNA, farão parte desta pesquisa 92 amostras dos seguintes grupos: HTLV-1 (n=39), HTLV-2 (n=35), HTLV não tipado (n=3), indeterminadas na sorologia (n=5) e negativas (n=10).

2) Técnica de LAMP para a amplificação do gene tax de HTLV-1 e 2: Amostras de

DNA de 92 indivíduos com resultados reagentes ou indeterminados por ELISA (CAMPOS et al., 2017) serão submetidas aos testes de LAMP para HTLV1 e 2 estabelecidos por nosso grupo de pesquisa (GOMES, 2017). Os testes de LAMP serão realizados com 5ul de DNA, num volume final de 25ul, em reações contendo: 8U de Bst DNA polimerase em 1X tampão de amplificação isotérmica (New England Biolabs), 0,4mM de dNTPs (Invitrogen), 0,8M de betaína (Sigma-Aldrich), e concentração final de 6mM de MgSO₄. Os iniciadores serão adicionados nas seguintes concentrações nas reações de LAMP para HTLV-1 e HTLV2: FIP e BIP a 40 pmoles, F3 e B3 a 5

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.065.937

pmoles, e LF e LB a 20 pmoles. As reações serão incubadas a 64°C por 1h, e inativadas a 80°C por 10 min. Os resultados serão avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen) em 1X tampão TrisBorato-EDTA (TBE) (Invitrogen), contendo 0,5X GelRed (Biotium), sendo aplicados 2ul do produto da reação, acrescido de 8ul de 1X TBE e 2ul de corante de aplicação (10X BlueJuice, Invitrogen). A corrida será realizada a 100V por 1h, e os resultados revelados por transiluminação UV e fotodocumentados (Sistema L-Pix, Loccus Biotecnologia, Brasil). Como controles negativos, serão realizadas reações contendo apenas água, ou DNA de indivíduo com sorologia negativa para HTLV-1/2. Serão consideradas positivas as reações com padrão de amplificação típico de LAMP, e negativas as amostras com ausência de amplificação. O resultado das reações também será revelado por adição de SYBRGreen (Invitrogen) aos tubos, e fotodocumentados durante transiluminação UV. Espera-se ausência de fluorescência nos tubos com resultado negativo, e fluorescência verde nos tubos com reação positiva.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

É solicitada dispensa do TCLE para as inclusões deste estudo com base no seguinte argumento:

"As amostras de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 que serão utilizadas no presente projeto decorrem do estudo "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população infectada pelo HIV-1 de São Paulo" aprovado pelo CTC-IAL número 106D/2012, e CEP-IAL número de protocolo CAAE 11302512.0.0000.0059. Elas estão sob a guarda/responsabilidade de Adele Caterino de Araujo, no Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, sala 1119, em freezer -20°C. As amostras que ainda existem no laboratório são finitas, e no presente estudo serão empregados apenas 10ul, não havendo sobra de material. Ressalta-se que houve assinatura de TCLE do projeto original que previa a comparação de vários testes sorológicos e moleculares para a confirmação do diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV2.

Assim, não haverá necessidade de novo TCLE tampouco de identificação dos sujeitos da pesquisa. Os dados que serão utilizados para comparação dos resultados obtidos são de domínio público, já que foram publicados em CAMPOS et al. 2017. Além disto, os tubos contendo as amostras de DNA proviral de HTLV-1 e HTLV-2 receberão apenas o número de identificação da amostra (1 a 127). Sendo assim, será solicitada a dispensa de aplicação de TCLE. Por outro lado, os responsáveis por esta pesquisa se comprometem a garantir a fidedignidade das informações relacionadas ao estudo, preservar o sigilo das informações individuais e incluir todos os participantes em uma futura publicação."

Também foram apresentados o TCLE do projeto anterior, citado na justificativa do pedido de dispensa, a aprovação do projeto pelo IAL, assinada por seu diretor, um acordo de colaboração em

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

**INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ**



Continuação do Parecer: 3.065.937

projeto de pesquisa, assinado pelos pesquisadores e diretores do INI e IAL, termo de compromisso com o sigilo da pesquisa.

Também está apresentado nesta versão do projeto de pesquisa o regulamento do biorepositório das amostras no INI.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Uma vez que o protocolo obedece as normas de condução de pesquisas em seres humanos regulamentadas pelo CNS/MS, indicamos sua aprovação de acordo com a Res. CNS no. 466/12 pelo CEP- INI com a previsão de relatórios semestrais de acompanhamento.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1213962.pdf	18/10/2018 11:07:08		Aceite
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	18/10/2018 11:04:27	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_anterior.pdf	11/09/2018 13:50:42	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	11/09/2018 13:50:13	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceite
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Yago_REV.docx	11/09/2018 13:47:21	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceite
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CTC_IAL_DG_IAL.pdf	04/09/2018 22:24:11	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceite
Declaração de Pesquisadores	a_ctc_0005_001_acordo_de_colaboracao_em_projeto_de_pesquisa_assinada.pdf	04/09/2018 22:22:51	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceite

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.065.937

Declaração de Pesquisadores	a_ctc_0004_001_termo_de_anuencia_d e_participacao_externo.pdf	04/09/2018 22:21:51	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceit
Declaração de Pesquisadores	a_ctc_0003_001_termo_de_anuencia_d e_participacao_ial_assinado.pdf	04/09/2018 22:21:40	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceit
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	04/09/2018 22:07:29	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceit

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 07 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo Coura
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA DO TESTE DE LAMP PARA A CONFIRMAÇÃO DE INFECÇÃO POR HTLV-1/2.

Pesquisador: Marcus Tullius Teixeira da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 98332818.9.3001.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.260.960

Apresentação do Projeto:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL número 3.130.994, de 04/02/2019.

Objetivo da Pesquisa:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL número 3.130.994, de 04/02/2019.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL número 3.130.994, de 04/02/2019.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a acrescentar ao parecer consubstanciado do CEPIAL número 3.130.994, de 04/02/2019.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Análise ética com base na carta de "Resposta às Pendências CEPIAL", assinada pela pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz (IAL) Adele Caterino de Araújo, de 08/02/2019, e documentos complementares, postados em 21/03/2019.

- Quanto a apresentação do documento de autorização para transferência das amostras do IAL para o Instituto Nacional de Infectologia (INI) / FIOCRUZ / RJ, a pesquisadora justificou que os documentos A-NIT-IAL-0016- Termo de Transferência de Material e A-NIT-IAL-0017- Guia de remessa do TTM somente poderão ser preenchidos e assinados pelo diretor após a aprovação do projeto pelo CEPIAL e seu cadastro final no Conselho Técnico Científico.

Endereço: Av. Dr. Amaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



Continuação do Parecer: 3.260.960

A pesquisadora encaminhou anexos os seguintes documentos que comprovam a Autorização de Transferência: a-ctc-0001-001_formulario_de_identificacao_do_projeto e a-ctc-0002-001_formulario_para_manifestacao_de_diretores, assinados e datados em junho de 2018 quando foi submetido o projeto à apreciação pelos responsáveis no Centro de Imunologia e onde constava o envio de material biológico.

Apresentou documento atualizado, de 07/02/2019, assinado por ela própria, com a ciência e a anuência da responsável pela Unidade Técnica DST, Elaine Lopes Oliveira, e da diretora do Centro de Imunologia, Carmem Aparecida de Freitas Oliveira, sobre a transferência de amostras de DNA proviral HTLV 1/2 do IAL para o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / FIOCRUZ / RJ.

Esclarecimento aceito.

- Na primeira relatoria teve-se o questionamento "Foi apresentada uma justificativa para dispensa do TCLE baseada no TCLE de estudo anterior; entretanto, não constava no TCLE que as amostras seriam armazenadas para estudos posteriores. Estava descrito no projeto anterior essa previsão? Como justificar o armazenamento não previsto e não declarado para uso em pesquisas futuras no TCLE? Esclarecer".

A pesquisadora Adele Caterino de Araújo assim esclareceu: "Em relação ao TCLE do projeto de Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV, de fato ele não previa armazenamento de amostra para uso futuro. No entanto, ele previa na 1ª fase detectar substâncias no sangue que apontam para a presença do vírus e na 2ª fase analisar a quantidade de vírus circulante através da detecção do seu material genético. Ocorre que houve a padronização e validação parcial da PCR em tempo real (qPCR) no formato multiplex para o diagnóstico confirmatório e determinação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2, porém sua validação de acordo com as normas estabelecidas pelo IAL em seu documento P-SG-0022-004 - Validação de métodos de ensaio de diagnóstico do IAL, foi recentemente finalizada (dezembro de 2018). Portanto, o material biológico (DNA proviral) estava em uso e não armazenado para uso no futuro e será empregado na validação da técnica LAMP".

Esclarecimento aceito.

- Outro questionamento levantado na primeira relatoria: "Como explicar a frase - As amostras que ainda existem no laboratório são finitas, e no presente estudo serão empregados apenas 10ul, não havendo sobra de material - ? Afinal, usar - apenas 10uL - esgota a amostra em repositório? Há somente 10uL de amostra em repositório, e essa é razão de considerar que as amostras são -

Endereço: Av. Dr. Amalido 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



Continuação do Parecer: 3.260.960

finitas - ?"

A pesquisadora do IAL Adele Caterino de Araújo esclareceu que "de fato com todos os testes realizados para validação da qPCR no IAL, restaram 92 amostras com volume aproximado de 10 microlitros que serão enviadas ao RJ, não havendo sobra de material biológico para ser armazenado no biorrepositório do INI/FIOCRUZ/RJ, tampouco no IAL".

Esclarecimento aceito.

- Foi apresentado o documento "Esclarecimentos sobre biorrepositório sob a guarda de Adele Caterino de Araújo: Normas Básicas para sua Utilização" para o protocolo de pesquisa "Determinação da acurácia do teste de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) para a confirmação de infecção pelos vírus linfotrópicos para células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1/2)", assinado e sem data, onde descreve-se: responsabilidade de guarda, restrição de acesso, condições de armazenamento, acondicionamento, local e temporalidade das amostras biológicas.

Documento de acordo.

Recomendações:

Em próxima edição do protocolo de pesquisa, apresentar ao CEP/IAL os documentos referentes à transferência do material biológico humano.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo de pesquisa, pela análise do conjunto dos documentos, foi considerado aprovado do ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa teve a primeira análise ética em reunião ordinária de 17 de janeiro de 2019, e após as respostas às pendências e a apresentação de documentos complementares, com base nas deliberações do colegiado foi aprovado à luz da Resolução CNS 466/2012.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Endereço: Av. Dr. Amalido 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 

Continuação do Parecer: 3.260.960

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delimitado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1273091.pdf	21/03/2019 22:09:05		Aceito
Outros	Docs_Anuencia_Chefias_IAL_06_2018.pdf	21/03/2019 22:08:21	Marcus Tullius Teixeira da Silva	Aceito
Outros	Anuencia_das_chefias_para_envio_de_amostras_2019.pdf	21/03/2019 22:07:56	Marcus Tullius Teixeira da Silva	Aceito
Outros	ESCLARECIMENTOS_SOBRE_BIORREPOSITORIO_SOB_A_GUARDA_DE_ADELE_CATERINO_DE_ARAUJO.pdf	21/03/2019 22:07:06	Marcus Tullius Teixeira da Silva	Aceito
Outros	Resposta_CEP/IAL_08022019.pdf	21/03/2019 22:03:16	Marcus Tullius Teixeira da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CTC_0005_001_acordo_de_colaboracao_em_projeto_de_pesquisaassinada_ACA.pdf	11/12/2018 15:19:04	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CTC_0004_001_termo_de_enuencia_de_participacao_externo.pdf	11/12/2018 15:16:11	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CTC_0003_001_termo_de_enuencia_de_participacao_ial_assinado.pdf	11/12/2018 15:15:45	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Outros	34K_2018_Ciencia_DG.pdf	11/12/2018 15:13:23	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Outros	34K_2018_cadastro_provisorio.pdf	10/12/2018 18:00:18	Deolinda Valéria Martins Pereira	Aceito
Declaração de Manuseio Material	Biorrepositorio.pdf	18/10/2018 11:04:27	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceito

Endereço: Av. Dr. Amaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES 

Continuação do Parecer: 3.260.960

Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	18/10/2018 11:04:27	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_anterior.pdf	11/09/2018 13:50:42	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	11/09/2018 13:50:13	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Yago_REV.docx	11/09/2018 13:47:21	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Abril de 2019

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-902
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 **Fax:** (11)3085-3505 **E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diagnóstico confirmatório das infecções por HTLV-1/2 pela técnica de LAMP

Pesquisador: OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 23369813.7.0000.5262

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 531.383

Data da Relatoria: 10/02/2014

Apresentação do Projeto:

A apresentação do estudo é clara e bem fundamentada. O estudo se justifica pela dificuldade atual de um diagnóstico de certeza da infecção pelo HTLV 1/2 e pela possibilidade de desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais precisas.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de um estudo objetivando a implementação e avaliação de um novo método molecular (LAMP) para o diagnóstico confirmatório da infecção pelo HTLV 1/2

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo traz benefícios potenciais no desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais acuradas para o diagnóstico, no entanto não há benefício direto para o paciente uma vez que o teste não está validado para o uso clínico. Riscos mínimos relativos à coleta de sangue em veia periférica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo relevante e bem fundamentado.

Realizadas adequações no projeto e TCLE solicitadas por este comitê.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE está adequado após as modificações solicitadas

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 531.383

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto e o temo de apresentação obrigatória (TCLE) encontram-se adequados às resoluções atuais. Realizadas adequações no projeto e TCLE sugeridas por este comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 17 de Fevereiro de 2014

Assinador por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br