



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Isabela Cristina de Oliveira Souza Ferreira

**Implementação de um diagnóstico molecular
confirmatório para o HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das
Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientadora: Profa. Dra. Rosana Antunes da Silveira

**Botucatu
2026**

Isabela Cristina de Oliveira Souza Ferreira

Implementação de um diagnóstico molecular
confirmatório para o HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientadora: Profa. Dra. Rosana Antunes da Silveira.

Botucatu
2026

F383i

Ferreira, Isabela Cristina de Oliveira Souza

Implementação de um diagnóstico molecular confirmatório para o HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu / Isabela Cristina de Oliveira Souza Ferreira. -- Botucatu, 2026

128 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Rejane Maria Tommasini Grotto

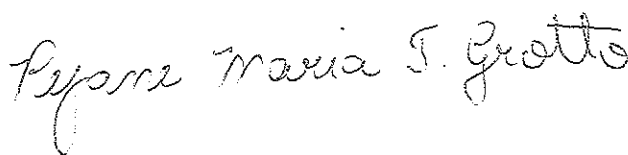
Coorientadora: Rosana Antunes da Silveira

1. Técnicas de diagnóstico molecular. 2. Infecções por HTLV-1. 3. Infecção por HTLV-2. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELA CRISTINA DE OLIVEIRA SOUZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 09 de janeiro de 2026, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ISABELA CRISTINA DE OLIVEIRA SOUZA, intitulada "Implementação de um diagnóstico molecular confirmatório para a detecção do vírus HTLV no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu ". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto de Proteção Vegetal / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA, Prof. Dr. JOSÉ CARLOS SOUZA TRINDADE FILHO (Participação Virtual) do(a) Depto de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB, Profa. Dra. MARIA CAROLINA QUARTIM BARBOSA ELIAS-SABBAGA (Participação Virtual) do(a) Depto de Parasitologia / Instituto Butantã de São Paulo, Após a exposição pela mestrandia e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTO



Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por tudo que tenho e pela oportunidade de concluir o mestrado, e a Nossa Senhora por sempre guiar meu caminho e minha vida.

Aos meus pais, Eliana e Edvaldo, por todo o apoio e incentivo aos meus estudos ao longo de toda minha trajetória acadêmica.

A minha família, principalmente ao meu tio Carlos, por todo apoio, incentivo e ajuda.

Ao meu marido Marcelo, por sempre me incentivar e estar sempre ao meu lado.

Agradeço à minha orientadora Rejane Maria Tommasini Grotto, e à minha coorientadora Rosana Antunes da Silveira, por todos os ensinamentos, paciência e ajuda no desenvolvimento desse projeto. E agradeço a todos os funcionários do LBA (Leonardo e Fabiana) e da rotina de biologia molecular (Gabriela, Maércio, Luiz) por toda a ajuda durante esse trabalho.

Agradeço à Dr^a Maria Gisele Gonçalves, que gentilmente doou os plasmídeos para os testes iniciais.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa pelas diversas experiências e aprendizagens ao longo do curso.

*Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é se não uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma
gota”.*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus associado a câncer em humanos, causando a leucemia de células T do adulto e outras doenças crônicas. Posteriormente, foi descrito o vírus HTLV-2, porém não foi estabelecida uma relação clínica com outras doenças. Com isso, a maioria dos casos da infecção são assintomáticas, dificultando o diagnóstico da doença. No Brasil, a triagem sorológica para o HTLV foi incorporada em 1993 como obrigatória em bolsas de sangue, sendo critério de exclusão em caso de positividade. Em 2009, passou a ser obrigatória também em doadores e receptores de órgãos ou tecidos e, em 2024, foi incluído o rastreamento em gestantes no pré-natal no Sistema único de Saúde (SUS). No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) são efetuados somente os testes sorológicos de triagem, que não são capazes de confirmar e diferenciar os subtipos, sendo recomendável que os resultados positivos na triagem sorológica sejam confirmados para exclusão de possíveis falso-positivos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um ensaio de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção e diferenciação do HTLV-1, HTLV-2, utilizando os genes *POL* e *TAX* como alvos virais e o gene da albumina humana como controle endógeno. Para a validação analítica e a construção da curva padrão foi utilizado um plasmídeo sintético, que permitiu determinar o limite de detecção (LoD), a repetibilidade e a reprodutibilidade. O LoD para o alvo *POL* foi de 100 cópias por reação, e para o gene *TAX*, foi de 25 cópias por reação. A aplicabilidade clínica foi confirmada pela testagem de amostras de pacientes, no qual o ensaio apresentou uma especificidade 100%. Entretanto, a baixa disponibilidade de amostras positivas dificultou a análise completa da sensibilidade. Contudo, os resultados demonstraram a eficácia do método, que atualmente encontra-se em processo de implementação no rol dos exames oferecidos pelo HCFMB.

Palavras chaves: Técnicas de diagnóstico molecular; Infecções por HTLV-1; Infecção por HTLV-2

ABSTRACT

The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) was the first retrovirus associated with cancer in humans, causing adult T-cell leukemia as well as other chronic diseases. Subsequently, HTLV-2 was described; however, no clear clinical association with other diseases has been established. As a result, most HTLV-2 cases remain asymptomatic, which hinders disease diagnosis. In Brazil, serological screening for HTLV was introduced in 1993 as a mandatory test for all blood donations, being a criterion for exclusion in cases of positivity. In 2009, screening also became mandatory for organ and tissue donors and recipients, and in 2024, prenatal screening for pregnant women was included in the Sistema Único de Saúde (SUS). At the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) only serological screening tests are performed, which are not able to confirm infection or differentiate between viral subtypes. However, it is recommended that positive serological results undergo confirmatory in order to exclude possible false positives. As such context, the aim of the present study was to develop and standardize a real-time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of HTLV-1 and HTLV-2 targeting the viral *pol* and *tax* gene, with the human albumin gene used as an endogenous control. For analytical validation and standard curve construction, a synthetic plasmid was employed, allowing the determination of the limit of detection (LoD), as well as the assessment of repeatability and reproducibility. The LoD was established at 100 copies per reaction for the *pol* target and 25 copies per reaction for the *tax* gene. Clinical applicability was confirmed through the testing of patient samples, in which the assay demonstrated 100% specificity. However, the limited availability of positive samples hindered a complete analysis of sensitivity. Nevertheless, the results demonstrated the effectiveness of the method, which is currently in the process of being implemented among the diagnostic assays offered at HCFMB.

Keywords: Molecular diagnostic techniques; HTLV-1 infections; HTLV-2 infection.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do HTLV.....	16
Figura 2: Esquema do genoma HTLV-1 e HTLV-2.....	16
Figura 3: Replicação viral do HTLV-1.....	19
Figura 4: Áreas endêmicas para o HTLV-1	20
Figura 5: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com o alvo POL 1	46
Figura 6: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo POL 2	47
Figura 7: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo TAX 1.....	47
Figura 8: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo TAX 2.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1: Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene POL	34
Tabela 2: Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene TAX	34
Tabela 3: Protocolo do volume dos reagentes utilizados para o gene POL e albumina para o HTLV-1 e HTLV-2	35
Tabela 4: Protocolo do volume do reagente utilizados para o gene TAX e albumina para HTLV-1 e HTLV-2	35
Tabela 5: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na PCR convencional para o gene TAX do HTLV-1	38
Tabela 6: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na Nested da PCR convencional para o gene TAX do HTLV-1	38
Tabela 7: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na PCR para o gene TAX do HTLV-2	40
Tabela 8: Determinação dos limites de detecção (LOD)	45
Tabela 9: Os parâmetros para cada alvo	46
Tabela 10: Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) em diferentes faixas de concentrações de DNA proviral para HTLV-1.	49
Tabela 11: Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) em diferentes faixas de concentrações de DNA proviral para HTLV-2.	50
Tabela 12: Resultados do ensaio de matriz: comparação entre controle(TE) e matriz (amostras negativas para HTLV)	51
Tabela 13: Valores de eficiência, slope e R^2 para o gene POL	51
Tabela 14: Valores de eficiência, slope e R^2 para o gene TAX	52
Tabela 15: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes do grupo 3	53
Tabela 16: Característica clínicas e epidemiológicas dos pacientes do grupo 4	54

Lista de Quadros

Quadro 1: Primers e sondas utilizados no ensaio multiplex qPCR HTLV para detecção de HTLV-1 e HTLV-2	33
Quadro 2: Modelo de placa de qPCR para detecção de HTLV	36
Quadro 3: Sondas utilizadas para cada gene.....	36
Quadro 4: Primers utilizados no sequenciamento genético do gene <i>TAX</i> do HTLV-1.....	37
Quadro 5: Primers utilizados no sequenciamento genético do gene <i>TAX</i> do HTLV-2.....	39

Lista de Abreviações e Siglas

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	<i>Antigen-Presenting Cells</i> – Células apresentadoras de antígenos
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i> – Leucemia/linfoma de células T do adulto
°C	Graus Celsius
cDNA	Complementary DNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLIA	<i>Chemiluminescent Immunoassay</i> – Ensaio de quimiluminescência imunológica
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cy5	Fluoróforo de cianina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiamio tetra-acético
EIA	<i>Enzyme Immune Assay</i> – Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática
et al.	Em conjunto com
FAM	<i>Fluoróforo 6-carboxi</i> – <i>Hexacarboxy fluorescein</i>
HAM/TSP	HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis – Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> – Vírus da hepatite B
HCFMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu);
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> – Vírus da hepatite C
HEX	<i>Fluoróforo 6-cloro</i> – <i>Hexachloro-Fluorescein</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i> – Vírus linfotrópico de células T humanas
HTLV-1	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 1</i> – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1);
HTLV-2	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 2</i> – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
Kb	kilobase
Kit	Conjunto de reagentes
LBA	Laboratório de Biotecnologia Aplicada
LIA	<i>Line Immunoassay</i> – Imunoensaio de linha
LOD	<i>Limit of Detection</i> – Limite de detecção
mL	Mililitros
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	<i>Particle Agglutination</i> – Aglutinação em partícula

pb	Pares de bases
Pb	Probe – Sonda
PBL	<i>Peripheral Blood Leukocytes</i> – Leucócitos do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
qPCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
qsp	Quantidade suficiente para
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão Tris-EDTA
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu;
WB	Western Blot
μL	Microlitros

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO	15
1.2	TRANSMISSÃO DO HTLV.....	17
1.3	REPLICAÇÃO VIRAL	17
1.4	EPIDEMIOLOGIA	19
1.5	COINFEÇÕES	22
1.6	ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO HTLV.....	22
1.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
2.	OBJETIVO GERAL	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3.	METODOLOGIA.....	29
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	29
3.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	30
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA	31
3.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)	32
3.6	SEQUENCIAMENTO	37
3.7	PLASMÍDEO E A CONSTRUÇÃO DA CURVA.....	41
3.8	ENSAIO DE PRECISÃO	43
3.9	ENSAIO DE MATRIZ.....	44
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	SENSIBILIDADE ANALÍTICA: LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO (LOD) DA qPCR.....	45
4.2	PRECISÃO.....	48
4.3	ENSAIO DE MATRIZ.....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	52
4.4.1	Grupo 1.....	52
4.4.2	Grupo 2.....	52
4.4.3	Grupo 3.....	53
4.4.4	Grupo 4.....	54
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	62
7.	REFERÊNCIAS.....	63

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	74
ANEXO 2 – POP-Procedimento Operacional Padrão.....	77
ANEXO 3 – RELATÓRIO TÉCNICO.....	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO

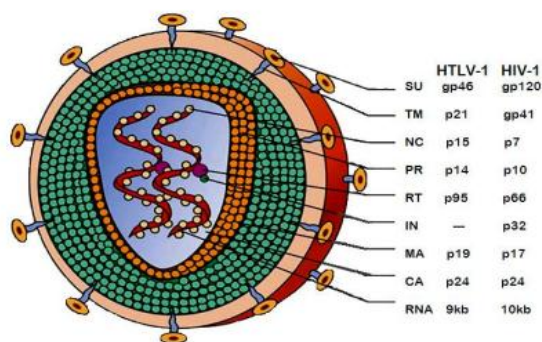
O vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus associado a câncer em humanos, tendo sido isolado de um paciente com linfoma cutânea de células T ^{1,2}. Além de causar a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), o HTLV-1 foi identificado como causador de várias doenças crônicas, como a mielopatia/ paraparesia espástica tropical associada ao HTLV-1(HAM/TSP), a uveíte associada ao HTLV-1 e a dermatite associada ao HTLV ^{3, 4}. Posteriormente, foi descrito o vírus HTLV-2, a partir de um paciente com tricoleucemia de células T ⁵, e os vírus HTLV-3 e HTLV-4 foram encontrados em indivíduos isolados de Camarões na África Central ^{6, 7, 8}.

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirina* e gênero *Deltaretrovirus*, e são considerados retrovírus envelopados complexos por expressarem genes regulatórios e acessórios, além dos genes estruturais e enzimáticos comuns a todos retrovírus ⁹. Os genomas de HTLV-1 e HTLV-2 apresentam aproximadamente 9.000 bases, formato esférica com 110 nanômetros ¹⁰, duas cópias idênticas de RNA fita simples ^{9, 11}, possuindo os genes *GAG*, *POL* e *ENV*, além de uma região próxima à extremidade 3' conhecida como região pX, que possui os genes reguladores *TAX* e *REX* ¹².

As proteínas e enzimas são codificadas por regiões específicas do genoma (Figura 1). O gene *ENV* codifica as proteínas do envelope e transmembranas (gp46 e gp21), o gene *GAG* codifica as proteínas estruturais da matriz (p19), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p15), enquanto o gene *POL*, está envolvido na codificação das enzimas protease, transcriptase reversa, e integrase que desempenham um papel na síntese do DNA viral a partir do RNA genômico, sendo essenciais para o início e a continuação do ciclo de replicação dos retrovírus, permitindo também a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. Já o gene *TAX* é responsável pela codificação das proteínas TAX-1 e TAX-2, sintetizadas respectivamente pelos vírus HTLV-1 e HTLV-2. Essas proteínas são fundamentais para a replicação viral, pois a proteína TAX-1/-2 ativa a transcrição do provírus ¹². Na região pX, são

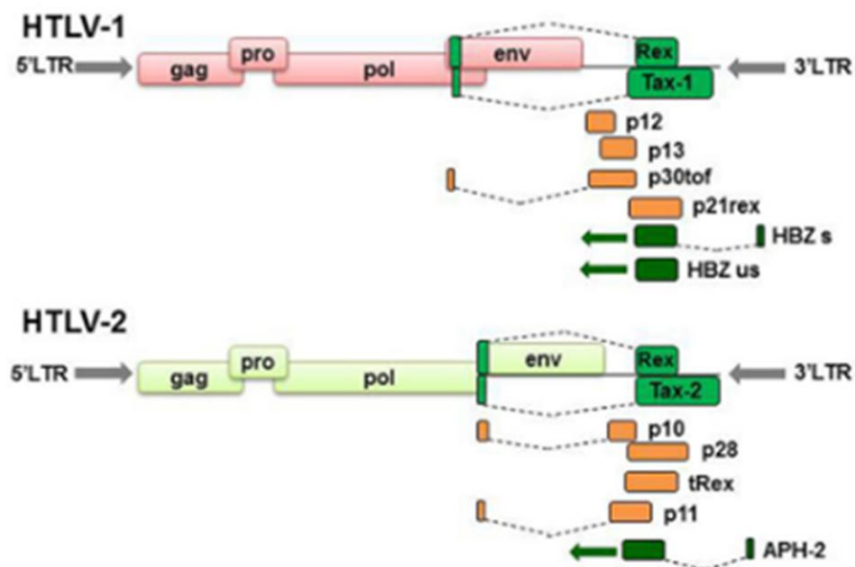
codificadas as proteínas acessórias (p12, p13, p30) que são responsáveis pela sinalização de início e término da transcrição ¹¹. Além disso, na extremidade 3' da região LTR do HTLV-1, o fator HBZ está associado à patogênese da HAM/TSP e da ATLL, atuando na persistência e carga viral ^{13,14} (Figura 2).

Figura 1: Representação esquemática do HTLV



Fonte: https://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0071402357/156712/figure172_3.htm.

Figura 2: Esquema do genoma HTLV-1 e HTLV-2



Fonte: Adaptado de ROMANELLI *et al.*, 2013, p. 2

1.2 TRANSMISSÃO DO HTLV

A transmissão do HTLV ocorre tanto horizontalmente como verticalmente, sendo que a transmissão horizontal ocorre por meio da transfusão de sangue e hemoderivados, compartilhamento de agulhas e seringas de usuários de drogas, transplante de órgãos e contato sexual desprotegido. E a transmissão vertical ocorre durante a gestação (da mãe infectada para o filho) ^{16,17}.

A transmissão vertical é considerada importante, com prevalência de 10 a 25% em áreas endêmicas ¹⁴. Essa transmissão pode ocorrer pela placenta, de forma perinatal ou por meio do aleitamento materno ¹⁸. No entanto, a principal via de transmissão é a amamentação, uma vez que o leite de mães soropositivas para o HTLV contém células T infectadas ^{16, 19, 20}. Para prevenir a transmissão vertical, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda a interrupção da amamentação em mães com HTLV ^{21, 22}.

A transmissão sexual do HTLV ocorre de forma mais eficiente a partir do homem para a mulher ²³, pois o vírus atravessa a barreira mucosa por meio de lesões na mucosa, infecção local ou transcitose de células epiteliais ²⁴.

A transmissão parenteral pode ocorrer por transfusões de sangue total, hemoderivados, compartilhamento de agulhas e transplante de órgãos. Essa é uma das formas mais eficientes de transmissão, com uma taxa de soroconversão de 44% ^{25, 14}. No entanto, no Brasil, o risco de transmissão parenteral é baixo, devido à sorologia obrigatória para doadores de sangue e órgãos ^{26, 22}.

1.3 REPLICAÇÃO VIRAL

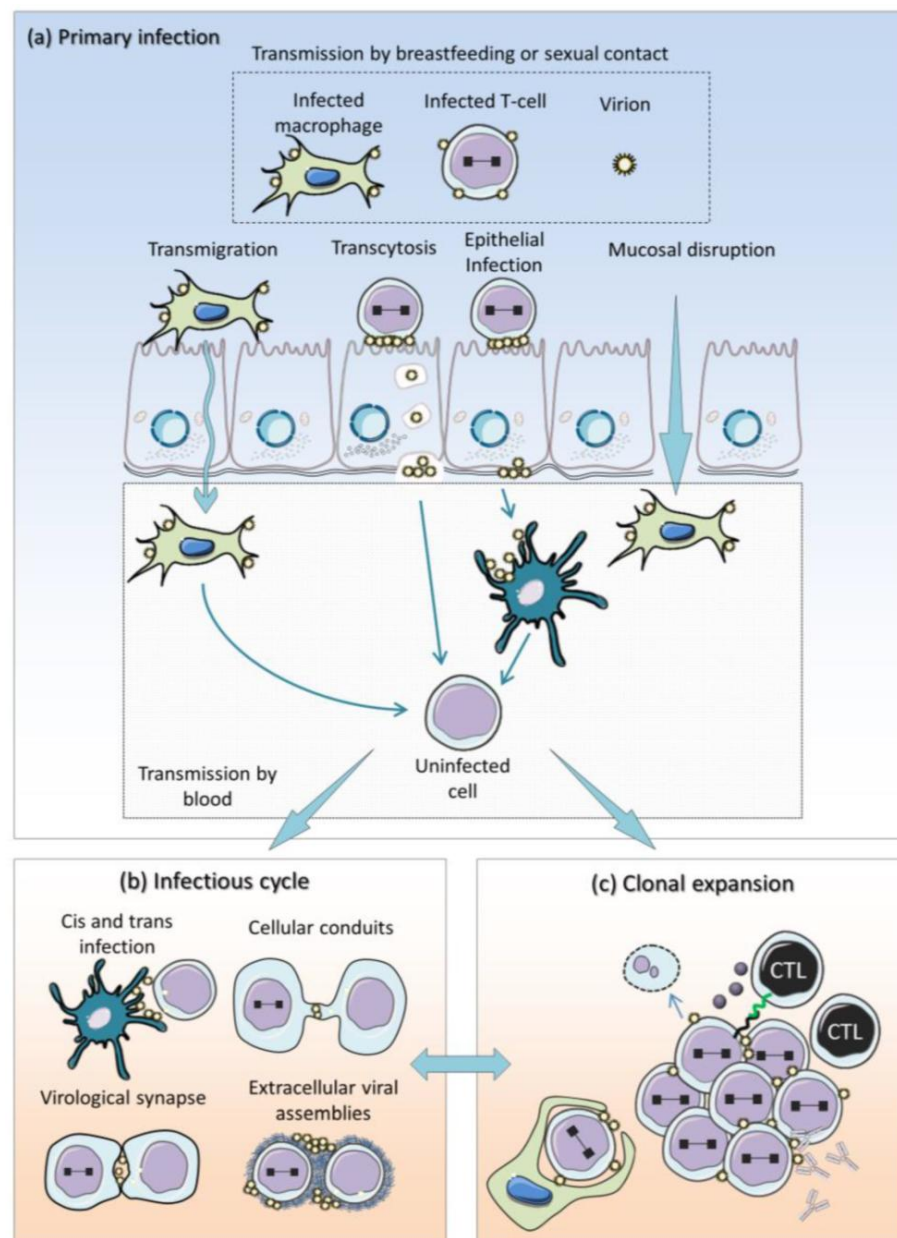
O HTLV-1 e HTLV-2 são os subtipos mais bem estudados, podendo o HTLV-1 infectar preferencialmente células CD4+, além de infectar linfócitos B, células endoteliais, células mieloides, fibroblastos e linfócitos TCD8+ ^{27, 28, 29, 30}, enquanto que o HTLV-2 infecta principalmente T CD8+ ³¹.

Com exceção da transmissão por sangue, nas vias de transmissão por aleitamento materno ou contato sexual, o HTLV precisa atravessar as barreiras

mucosa oral, gastrointestinal ou cervical, o que pode ocorrer por diferentes mecanismos. Para isso, o vírus utiliza diferentes estratégias, como: transmigração de macrófagos infectados pelo epitélio intacto, a incorporação dos vírions em vesículas, a liberação de partículas virais na superfície de células epiteliais e a entrada de células infectadas em áreas com mucosa danificada^{16,32}.

Após ultrapassar essa barreira, o HTLV pode infectar diretamente células do sistema imunológico ou utilizar células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, para disseminação^{16, 19, 32}. Essas APCs podem ser diretamente infectadas ou mediar a transinfecção, processo pelo qual transferem vírions a outras células suscetíveis. Essa transferência pode ocorrer por vários mecanismos: sinapse virológica³³, condutores celulares³⁴ ou conjuntos virais extracelulares³⁵(Figura 3).

Logo após o estabelecimento da infecção primária, o vírus se replica por meio da transmissão célula a célula, ligando a célula alvo por meio de receptores de superfície celular, como moléculas transportadoras de glicose 1 e proteoglicanos de heparina sulfato 1³⁶, sendo necessária a evasão do sistema imunológico para a disseminação^{16,32}. Esse processo facilita a adsorção do vírus, mediada pela ligação de glicoproteínas aos receptores de membrana dos linfócitos T. Em seguida, ocorre a fusão da membrana viral com a célula hospedeira, permitindo a liberação do cerne viral no citoplasma. Com isso, a transcriptase reversa sintetiza uma fita de DNA complementar (cDNA), que, através da ação da enzima integrase viral, é incorporada ao DNA celular, formando o provírus integrado. A partir do DNA provírus como molde, ocorre a síntese do RNA viral, do RNA genômico e RNA mensageiro que é responsável pela síntese das proteínas do capsídeo e do envelope viral. O RNA viral é empacotado, seguido pela montagem do capsídeo e pelo brotamento do vírus. No final do processo ocorre a maturação, que torna a partícula viral madura e capaz de infectar novas células^{12, 14}.

Figura 3: Modelo de replicação viral do HTLV-1

Fonte: Adaptado de Carpentier *et al.*, 2015.

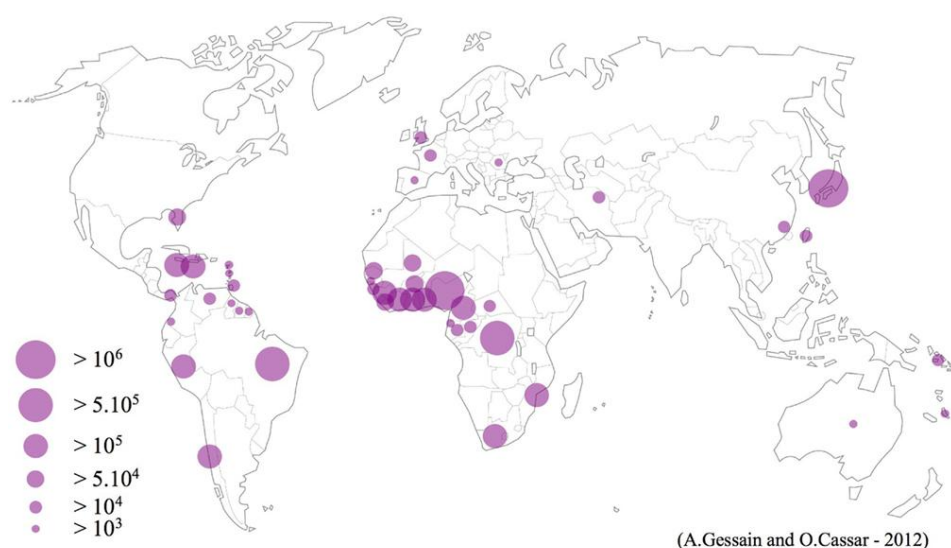
1.4 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência do HTLV-1 e HTLV-2 variam conforme a localização geográfica, fatores epidemiológicos e populações específicas, como gestantes, doadores de sangue e indivíduos coinfectados. O HTLV-1 é endêmico na América do Sul, Japão, Caribe, África, além de regiões do Oriente Médio e Melanésia, com uma estimativa entre 15 a 20 milhões de pessoas infectadas

em todo o mundo ^{37,38}. No entanto, esses números baseiam-se em estudos em áreas endêmicas, assim o número de infectados, principalmente assintomáticos, pode ser muito maior. Já o HTLV-2 foi identificado em áreas urbanas das Américas, Europa e Ásia, especialmente entre usuários de drogas e populações indígenas da América Latina ^{12,14, 39}.

O Japão foi uma das primeiras regiões identificadas como endêmicas para o HTLV-1 ⁴⁰. No mesmo período, também foi relatada uma alta soroprevalência do vírus em países da África e da Ásia. Dessa forma, tanto o Japão quanto a África podem ser considerados locais com o maior número de infectados pelo HTLV-1 ³⁹. Na América do Sul, a presença do vírus é significativa ⁴¹. (Figura 4).

Figura 4: Áreas endêmicas para o HTLV-1



Fonte: Gessain e Cassar, 2012

No Brasil estima-se aproximadamente 2,5 milhões de brasileiros infectados pelo HTLV-1, tornando o Brasil o país com o maior número absoluto de indivíduos convivendo com o vírus ^{37, 38}. O HTLV-2 também está presente no país, sendo predominantemente encontrado entre populações indígenas da Amazônia brasileira, o que faz da região uma das maiores áreas endêmicas para o HTLV-2 no mundo ^{41, 42}.

O HTLV-1 foi identificado pela primeira vez na cidade de Campo Grande, em um grupo de imigrantes de japoneses provenientes de uma região

altamente endêmica ⁴³. Mais tarde, a infecção pelo HTLV também foi detectada entre povos indígenas brasileiros ^{41, 44}.

A partir de 1993, a detecção de HTLV foi incorporada à triagem sorológica obrigatória realizada em bolsas de sangue, sendo, portanto critério de exclusão em caso de positividade ²⁶. Essa medida permitiu a realização de estudos sobre a prevalência do vírus, contribuindo no entendimento do vírus ¹⁴.

Entre 2012 e 2018, a Unidade Federativa da Bahia implementou a notificação compulsória, resultando no registro de 2.486 casos de infecção pelo vírus. Outros estudos foram realizados em doadores de sangue de 12 estados brasileiros, nos quais foram encontradas taxas mais altas nas regiões Norte e Nordeste, com prevalências de 0,48% na Bahia ⁴⁵ e 0,46% no Acre. Especificamente em Salvador, a prevalência na população geral é de aproximadamente 1,48% ²³, e nas gestantes a taxa foi de cerca de 1,05% ⁴⁶.

Já, na região Sul, as prevalências foram menores, registrando 0,10% em São Paulo e 0,03% em Santa Catarina, demonstrando uma distribuição heterogênea nas taxas de prevalência para HTLV-1/2 ⁴⁶.

Além disso, estudos realizados na região Central do Brasil, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, identificaram uma prevalência de 0,5% do HTLV-1 em assentamentos remanescentes de quilombos ^{38, 47}.

A prevalência nas populações vulneráveis também é elevada no Brasil, sendo esse grupo composto por usuários de drogas, profissionais do sexo, parceiros sexuais de portadores de HTLV, pacientes que receberam transfusão sanguíneas antes de 1993, pacientes imunossuprimidos e indivíduos com outras doenças infecciosas, como HIV, HCV e HBV que apresentam prevalência variando de 0,7% a 5,3% ^{46, 48, 49}.

No Brasil, a infecção pelo HTLV-1/2 foi incluída na lista de notificação compulsória para gestante, puérpera e em criança com risco de transmissão vertical. Além disso, a testagem sorológica foi ampliada para gestantes durante o pré-natal em 2024. Essas ações representam avanços na prevenção, com a adoção de estratégias para reduzir a transmissão, permitindo estimar o número de pessoas infectadas e aprimorar o atendimento dessa população ^{50,51}.

1.5 COINFEÇÕES

As taxas de coinfeção HIV/HTLV variam geograficamente, seguindo uma distribuição semelhante ao do HTLV-1. As coinfeções atingem principalmente a população mais vulnerável, como os usuários de drogas injetáveis. Na Bahia, 16% dos pacientes com HIV, apresentam coinfeção com o HTLV. A coinfeção do HIV/HTLV-1 acelera a evolução da AIDS, diminuindo a expectativa de vida dos pacientes, enquanto a coinfeção do HIV/HTLV-2 pode oferecer proteção contra a progressão da AIDS ⁵², provavelmente pela produção de citocinas que bloqueiam o correceptor CCR5 do HIV ^{53, 54}, além disso, estudos demonstram que o proteína Tax-2 tem maior capacidade de inibir a replicação do HIV-1 em comparação ao Tax-1 ⁵⁵.

As coinfeções pelos vírus da hepatite B e C ainda estão sendo estudadas cientificamente, apresentando resultados divergentes no caso da coinfeção HCV/HTLV. Estudos realizados no Japão indicaram que pacientes coinfectados por HCV/HTLV-1 apresentam maior ocorrência de lesões hepáticas ⁵⁶. No entanto, em contraste com estudos brasileiros, pacientes coinfectados por HIV-1/HTLV-1/HCV demonstraram menor evolução para lesões hepáticas, demonstrando um possível efeito protetor do HTLV-1. Uma explicação possível para esses resultados divergentes são as diferenças entre as populações estudadas ⁵⁷. Já a coinfeção HIV-1/HTLV-1/HBV ainda é pouco compreendida ⁵⁸.

Consistente com os resultados encontrados na coinfeção HCV/HTLV-1, pacientes coinfectados com HCV/HTLV-2 apresentaram menor carga viral para o HCV em estudos conduzidos em São Paulo. No entanto, nos EUA, pacientes coinfectados por HCV/HIV e HCV/HIV/HTLV-2 apresentaram maior carga viral para o HCV. Essas divergências podem estar relacionadas à origem genética dos pacientes ou aos diferentes subtipos de HTLV-2 que circulam no Brasil e nos EUA ⁵⁷.

1.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO HTLV

A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática; no entanto, entre 5% e 10% desenvolvem manifestações

clínicas⁵⁹. As doenças associadas ao HTLV-1 podem ser inflamatórias, como mielopatia, uveíte, dermatite, conjuntivite, artrite e alveolite; infecciosas, incluindo estrongiloidíase, escabiose, dermatite infectiva e tuberculose; ou neoplásicas¹⁴. As complicações mais graves são HAM/ TSP e o ATLL, geralmente após um período de latência de 20 a 30 anos^{14, 60}. Por outro lado, o HTLV-2 não está associado à alterações hematológicas, mas eventualmente tem sido relacionado à distúrbios neurológicos que se assemelha ao HAM/TSP^{12, 61}. Já o HTLV-3 e o HTLV-4 não apresentam associação com doenças conhecidas⁶².

A HAM/TSP, denominada Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical é uma doença inflamatória neurodegenerativa causada pela proliferação e ativação de células T infectadas pelo HTLV-1. Esse processo leva à liberação de citocinas (IL-1, IL-6, IL-15, IFN- γ e TNF- α), quimiocinas (CXCL10 e CXCL9) e à infiltração de células mononucleares, resultam em desmielinização crônica, disfunção axonal e atrofia da medula espinhal. Assim, os sintomas da HAM/TSP incluem enfraquecimento progressivo das extremidades inferiores, dores lombares, incontinência urinária e distúrbios no intestino^{63, 64}. Atualmente, o tratamento clínico disponível é apenas paliativo, não havendo tratamentos curativos⁶⁵.

A Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), caracterizada pela presença de células leucêmicas, que se infiltram em diversos tecidos, como pele, fígado, trato gastrointestinal e pulmões. Além disso, a doença está associada a hipercalcemia e a infecções oportunistas⁵⁹. Geralmente, se manifesta após um período de latência de 20 a 30 anos⁶⁶, sendo que a minoria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 evolui para ATLL, pois a imunossupressão nesses casos contribui para o surgimento da doença. Assim, o sistema imunológico dos pacientes atua no controle da doença, prevenindo o desenvolvimento da doença⁵⁹.

Pacientes com ATLL em um estado de imunossupressão severa tornam-se altamente vulneráveis a infecções oportunistas. Nos casos mais agressivos, antibióticos são administrados para prevenir complicações infecciosas. Dentre as infecções oportunistas mais comuns estão *Pneumocystis carinii*, *Strongyloides stercoralis*, aspergilose, candidíase e pneumonia por citomegalovírus⁶⁷.

A ATLL é classificada em dois subtipos principais: agressivo e indolente. O tipo agressivo é caracterizado pelo crescimento rápido das células leucêmicas e inclui as formas aguda e linfoma. Já o tipo indolente tem uma progressão mais lenta e abrange as formas crônica e latente ⁶⁸. Os pacientes com a forma agressiva da ATLL apresentam uma sobrevida inferior a um ano, enquanto aqueles com a forma indolente podem evoluir para uma crise blástica após vários anos ⁶⁷.

1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial de HTLV divide-se em testes de triagem e confirmatórios. Os exames de triagem são baseados na detecção de anticorpos contra HTLV-1/2 no plasma ou soro, sendo: reação imunoenzimática (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay* ou EIA, *enzyme immunoassay*), aglutinação de partículas (PA, *particle agglutination*) e quimioluminescência (CLIA, *chemiluminescent assay*). Os testes confirmatórios podem identificar anticorpos: Western Blot (WB) e imunoensaios em linha (LIA, *line immunoassay*). E ainda, testes baseados na amplificação do material genético proviral: reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). É recomendável que os resultados positivos na triagem sorológica sejam confirmados para exclusão de possíveis falso-positivos, uma vez que se tratam de testes com alta sensibilidade ¹⁷.

Os testes imunoenzimáticos foram evoluindo ao longo tempo, permitindo uma melhor sensibilidade e especificidade. Os testes de primeira geração utilizavam um lisado viral de HTLV-1 fixado, sendo também aplicados para HTLV-2, porém apresentava baixa sensibilidade. Já os testes de segunda geração incluíram proteínas recombinantes do envelope viral (gp21) e lisado viral de HTLV-2, aumentando a sensibilidade para HTLV-1/2. E os testes de terceira geração, atualmente utilizados, incorporam proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos específicos para HTLV-1/2, melhorando a sensibilidade. Porém, esses testes não permitem diferenciar a infecção por HTLV-1 ou HTLV-2 ^{14, 69, 70}.

O teste de aglutinação de partículas foi um dos primeiros a serem utilizados para diagnosticar o HTLV devido à sua técnica simples e boa sensibilidade. Porém, no Brasil, não é muito utilizado ⁷¹.

Os testes de quimioluminescência (CLIA) em plataformas automatizados têm sido utilizados nos bancos de sangue para triagem sorológica. Esses testes detectam os anticorpos que interagem com micropartículas magnéticas, que são revestidas com peptídeos sintéticos do HTLV-1 (gp46-I) e HTLV-2 (gp46-II), além de proteínas recombinantes do envelope (gp21). Apesar de apresentarem alta sensibilidade, eles podem gerar falso-positivos, principalmente em grupos de baixo risco, como doadores de sangue, gerando a necessidade da realização de testes confirmatórios ^{70, 72 73}.

Os testes confirmatórios são essenciais nos casos de resultado reagente nos testes de triagem. Assim, um dos métodos mais utilizados para essa confirmação é o Western Blot (WB), que consiste na separação de antígenos virais por eletroforese, em seguida, é realizada a leitura das bandas específicas ⁷⁴.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera um resultado positivo quando há reatividade para bandas específicas de proteínas do envelope (gp46 e gp21 ou gp62/63) e para bandas da região gag (p19, p24 e p53) ⁷⁵. Porém, algumas amostras apresentam reatividade em determinadas bandas, mas não podem ser considerada como positivas, sendo, classificadas como indeterminadas. Esses casos indeterminados não são totalmente compreendidos, acredita-se que alguns indivíduos possam ter uma resposta sorológica inadequada, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Além disso, presença de partículas virais defeituosas, mutações e coinfeções podem causar reações cruzadas, dificultando a detecção do HTLV ^{12, 14, 73, 76}.

Para melhorar o diagnóstico, foram adicionadas proteínas recombinantes do envelope (rgp46-I e rgp46-II), permitindo diferenciar o HTLV-1 do HTLV-2. Além disso, o peptídeo recombinante GD21 foi incorporado ao WB na tentativa de reduzir os casos indeterminados (WB 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore). No entanto, devido ao alto custo e à possibilidade de casos inconclusivos, o uso do WB apresenta dificuldades ^{12, 76}.

Outros dois testes podem ser utilizados para a confirmação: a Imunofluorescência Indireta (IFI) e o Imunoensaio em Linha (LIA). A IFI baseia-

se na interação entre os anticorpos da amostra e os antígenos virais fixados em lâminas, apresentando boa sensibilidade e especificidade. No entanto, a interpretação dos resultados pode ser subjetiva, sendo o método utilizado na confirmação de casos com resultados discordantes ^{77, 78}. A LIA utiliza uma membrana de nylon com proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos do HTLV-1/-2, apresentando maior sensibilidade do que o WB e reduz os casos inconclusivos, porém, o alto custo dificulta a sua utilização no Brasil ⁷⁹.

No entanto, devido às limitações de outros métodos e o HTLV se caracterizar como provírus, os testes moleculares fornecem um diagnóstico confirmatório e discriminatório, especialmente em casos indeterminados ^{80,81}. Além disso, as técnicas de PCR apresentam alta sensibilidade e especificidade, e boa reprodutibilidade ⁸². Sendo capaz de diagnosticar a infecção neonatal, uma vez que os anticorpos maternos circulam no recém-nascido durante os primeiros meses de vida ⁸³.

A PCR é um método de amplificação exponencial de sequências específicas do genoma, esse processo ocorre devido à ação de uma enzima polimerase resistente a variações de temperatura. A reação é específica devido a utilização de oligonucleotídeos desenhados para amplificar, uma região alvo no DNA. O resultado da reação é analisado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Por sua vez, a técnica de PCR em tempo real proporciona um resultado mais rápido e sensível, utilizando o mesmo princípio da PCR convencional, porém a partir do uso de intercalantes de DNA ou sondas fluorescentes que emitem um sinal luminoso durante a amplificação, permitindo a detecção em tempo real pelo equipamento ⁸².

Os testes moleculares empregam primers e/ou sondas específicas para regiões do genoma proviral do HTLV-1/2. O HTLV realiza a transcrição reversa de seu genoma de RNA viral em DNA fita dupla, que se integra ao genômico do hospedeiro, formando o provírus. Esse provírus serve como molde para a produção de novas partículas virais e apresenta a característica de manter o número de cópias longo da infecção crônica, não por meio da liberação de partículas virais livres, mas pela expansão clonal e persistência de clones de células T infectadas ^{84,85}. Por esse motivo o diagnóstico molecular deve ser realizado a partir do DNA proviral. Porém, resultados falso-negativos podem ocorrer devido à extração de DNA ruim, baixa carga proviral ou presença de

partículas defeituosas ou mutadas. No entanto, devido ao menor custo dos testes moleculares em comparação aos testes sorológicos complementares (LIA e WB), recomenda-se a sua utilização inicial, e se necessária a utilização dos testes sorológicos para amostras com resultados inconclusivos ⁷³.

No entanto, não há testes moleculares disponíveis comercialmente para o HTLV, além de uma divergência nos protocolos, regiões do genoma, primers e sondas, plataformas, reagentes e definição de casos positivos ⁷³. Com isso, alguns grupos de pesquisa desenvolveram protocolos para o diagnóstico molecular, para detecção e identificação de HTLV-1/-2 ^{80,81}. Ensaio multiplex quantitativo de PCR em tempo HTLV, visando os genes *POL* e *TAX*, demonstraram viabilidade no diagnóstico e discriminação do HTLV-1 e HTLV-2 ⁸⁰.

Portanto, os testes sorológicos de triagem não diferenciam se a infecção é causada por HTLV-1 ou HTLV-2, sendo necessários testes de elevada especificidade para a diferenciação, principalmente, por doenças como HAM e ATLL causadas pelo HTLV-1 terem alta morbidade e mortalidade ⁴⁶. A implantação de um teste diagnóstico molecular para detecção de HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) possibilitará a confirmação e a definição do tipo viral, proporcionando melhorias no tratamento dos indivíduos infectados. Com tal perspectiva, este trabalho otimizou o teste descrito por Gonçalves *et al.*, (2022), de forma a obter redução de custos em todo o fluxo de trabalho envolvido, adequando-o à necessidade local do HCFMB.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi implementar um teste molecular confirmatório para detecção e diferenciação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o processo de extração de DNA *in house* de leucócitos de sangue periférico;
- Otimizar a metodologia para detecção e identificação de HTLV-1 e HTLV-2;
- Realizar a validação analítica do teste no Laboratório de Biotecnologia Aplicada(LBA);
- Gerar o documento final denominado procedimento operacional padrão (POP) contendo as etapas do fluxo de trabalho como solicitação, coleta, recebimento e processamento de amostras e liberação dos resultados.

3. METODOLOGIA

As amostras foram provenientes de pacientes em acompanhamento no Serviço de Ambulatórios Especializados em Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM) e de doadores de sangue do HCFMB. Posteriormente, foi realizada a extração de ácidos nucleicos de leucócitos por coluna de sílica. O material genético extraído foi utilizado em um ensaio de PCR em tempo real multiplex qualitativo com metodologia “*in house*” para detecção e diferenciação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2. Após a otimização do ensaio foram empregados testes de validação analítica.

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Neste estudo, foi realizada coleta de amostras de sangue total de pacientes e doadores de sangue, sendo categorizados nos seguintes grupos:

Grupo 1: Amostras de pacientes positivos com um diagnóstico prévio pela infecção do HTLV e pacientes com teste sorológico inconclusivos ou em baixos títulos para HTLV em acompanhamento no Ambulatório de Infectologia do HCFMB.

Grupo 2: Amostras de doadores de sangue em triagem sorológica para HTLV, com técnica em comparação ao ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories) realizado no Hemocentro do HCFMB.

Grupo 3: Amostras de pacientes que vivem com HIV, sendo amostras excedentes processadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA) pertencente à Rede Nacional de Carga Viral do HIV/HBV/HCV do Ministério da Saúde.

Grupo 4: Amostras de pacientes coinfectados por HIV, HBV e/ou HCV, sendo amostras excedentes processadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA), pertencente à Rede Nacional de Carga Viral do Ministério da Saúde.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) FMB/UNESP, no dia 30 de Setembro de 2024, sob o número de parecer 7.111.244 e CAAE 80402524.1.0000.5411. Os pesquisadores tiveram acesso somente à informação codificada para garantir a guarda dos dados e confidencialidade do indivíduo. Neste contexto, os dados provenientes deste estudo foram utilizados apenas para os fins descritos e foram cumpridas todas as diretrizes no diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados. Foram consideradas duas possibilidades de coleta:

- 1) Amostras provenientes do Serviço de Ambulatórios Especializados em Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM) e aos doadores de sangue: foram coletados 4 ml de sangue total em tubo de EDTA. Foi aplicado a todos os participantes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).
- 2) Amostras excedentes no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA): para as amostras excedentes à Rede Nacional de Carga Viral do HIV/HBV/HCV do Ministério da Saúde, foi solicitado ao paciente via telefone cadastrado, o seu consentimento em um formulário fornecido via plataforma Google Forms. Nos casos em que não foi possível obter resposta, CEP aprovou a dispensa da aplicação do TCLE.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Nesse projeto foram incluídas amostras de pacientes com idade acima de 18 anos que assinaram o TCLE. Além disso, foram incluídos pacientes positivos para HTLV por sorologia em acompanhamento ambulatorial, doadores de sangue em triagem sorológica para HTLV, pacientes infectados por HIV, e pacientes coinfectados por HIV e/ou HBV e/ou HCV. Amostras que não atenderam os critérios de inclusão foram excluídas da pesquisa.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA

A coleta das amostras de sangue foi realizada por enfermeiras dos serviços de saúde e, posteriormente, encaminhada ao laboratório para processamento. Foram coletados 4 mL de sangue total em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação a 2900 rpm por 5 minutos, permitindo a separação do plasma e dos leucócitos do sangue periférico (PBL, *peripheral blood leukocytes*).

O processamento do PBL seguiu uma metodologia *in house* desenvolvida para promover a lise dos eritrócitos remanescentes. Para isso, 14 mL de solução tampão de lise de eritrócitos [10 mM de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), 144 mM de cloreto de amônio (NH_4Cl) em 1L de água ultrapura] foram adicionados ao PBL em um tubo Falcon, seguido de agitação em gangorra por 10 minutos para facilitar a quebra dos eritrócitos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 2900 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o precipitado de PBL foi lavado, ressuspenso em 250 μL do mesmo tampão de lise e armazenado a -70°C para posterior extração de DNA.

Inicialmente a extração do DNA proviral também foi realizada utilizando uma metodologia desenvolvida *in house* no laboratório. Para essa abordagem, foram preparados o tampão de lise, tampão de lavagem 1 e o tampão de lavagem 2. No entanto, os resultados não foram satisfatórios. Diante disso, optou-se pela substituição por reagentes comerciais.

Conforme padronizado, a extração do DNA foi realizada a partir do PBL com tampão de lise. Inicialmente, a amostra foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, seguida da remoção do sobrenadante. Em seguida, foram acrescentados 140 μL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), 20 μL de Proteinase K (20mg/mL) (Loccus, LTDA, São Paulo, Brasil) e 560 μL de Cobas®Omni Lysis Reagent (Roche Molecular Systems, CA, USA). A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada por 10 minutos à 56°C .

Posteriormente, foram acrescentados 560 μL de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido de nova homogeneização em vórtex. A solução resultante foi transferida para uma coluna de sílica em alíquotas de 630 μL e submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto, repetindo-se o processo para garantir uma adsorção completa.

As etapas de lavagem foram realizadas com a adição de 500 µL do reagente Cobas® Omni Wash (Roche Molecular Systems, CA, EUA), seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. O procedimento foi repetido com uma nova alíquota de 500 µL do mesmo reagente, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. Uma etapa final de centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto foi realizada.

O material genético retido na coluna de sílica foi eluído em 60 µL de Buffer AE Elution Buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e submetido à centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Ao final do processo de remoção, o DNA eluído foi armazenado no freezer a -20 °C.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), permitindo a determinação da concentração e pureza do material genético. Em seguida, o DNA extraído foi diluído para uma concentração de 100ng/µL, sendo utilizado na qPCR.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

A detecção do DNA proviral do HTLV-1 e HTLV-2 por qPCR foi realizada utilizando o sistema de sondas de hidrólise (TaqMan®). Foram empregados primers e sondas direcionadas às regiões alvo dos genes *TAX* (região pX) e *POL* ambos para HTLV-1 e HTLV-2⁸⁰. Além disso, o segmento do gene da albumina foi utilizado como controle endógeno, permitindo a confirmação do processo de extração e amplificação do DNA genômico.

Os primers e sondas utilizados foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies (IDT)*, e suas sequências, bem como sua localização no genoma do HTLV-1 e HTLV-2, estão descritas no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1: Primers e sondas utilizados no ensaio multiplex qPCR HTLV para detecção de HTLV-1 e HTLV-2

Genes	Primers/sondas	Sequência (5'-3')	Localização
POL	HTLV-1 F	GAACGCTCTAATGGCATTCTTAAAACC	4.788-4.814
	HTLV-1 R	GTGGTTGATTGTCCATAGGGCTAT	4.895-4.872
	HTLV-1 Pb	FAM- ACTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGG	4.828-4.857
	HTLV-2 F	CAACCCACCAGCTCAGG	4.740-4.757
	HTLV-2 R	GGGAAGGTTAGGACAGTCTAGTAGATA	4.830-4.804
	HTLV-2 Pb	Cy5- TGGTCGAGAGAACCAATGGTRTAATCAAAA	4.760-4.789
TAX	HTLV-1 F	CGGATACCCAGTCTACGTGTT	4.359-7.379
	HTLV-1 R	CAGTAGGGCGTGACGATGTA	7.458-7.439
	HTLV-1 Pb	FAM-CTGTGTACAAGGCGACTGGTGCC	7.386-7.408
	HTLV-2 F	CGATTGTGTACAGGCCGATTG	7.272-7.292
	HTLV-2 R	CAGGAGGGCATGTCTCGATGTAG	7.347-7.327
	HTLV-2 Pb	Cy5-TGTCCCGTCTCAGGTGGTCTATGTTCCA	7.294-7.321
Albumina	Albumin F	GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA	16.222-16.245
	Albumin R	GGGCATGACAGGTTTTGCAATATTA	16.351-16.327
	Albumin Pb	HEX- TCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTCTAGGC	16.290-16.319

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*; FAM, 6-carboxy-fluorescein; CY5, *cyanine dye*; HEX, *phosphoramidite dye*; R, *degenerate base- recognition of A or G bases*.

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2022.

A concentração ideal dos oligonucleotídeos (primers e sondas) foi determinada a partir de uma série de reações utilizando diferentes combinações de concentrações de primers (*forward* e *reverse*) e sonda para cada alvo (HTLV-1, HTLV-2 e albumina).

Após a determinação da concentração dos primers e sondas para a qPCR, foram preparadas soluções de trabalho resultando em dois conjuntos finais de primers e sondas, um para o alvo *POL* e outro para *TAX*. Os volumes preparados são adequados para a realização de 200 testes, conforme descrito nos Tabela 1 e 2 a seguir.

Tabela 1: Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene *POL*

Para Pol - HTLV	[Estoque uM]	[final na PCR (uM)]	Volume reação	Volume para 200 testes
Primer HTLV-1-F	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-F	100	0,6	0,12	24
Primer HTLV-2-R	100	0,5	0,1	20
Primer HTLV-1-P	100	0,15	0,03	6
Primer HTLV-2-P	100	0,15	0,03	6
Primer Album-F	100	0,05	0,01	2
Primer Album-R	100	0,1	0,02	4
Primer Album-P	100	0,15	0,03	6
			Total	100

Legenda: F, Forward; R, Reverse; Pb, Probe.

Tabela 2: Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene *TAX*

Para Tax - HTLV	[Estoque uM]	[final na PCR (uM)]	Volume reação	Volume para 200 testes
Primer HTLV-1-F	100	0,2	0,04	8
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-F	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-1-P	100	0,15	0,03	6
Primer HTLV-2-P	100	0,15	0,03	6
Primer Album-F	100	0,05	0,01	2
Primer Album-R	100	0,1	0,02	4
Primer Album-P	100	0,15	0,03	6
			Total	80

Legenda: F, Forward; R, Reverse; Pb, Probe.

Para a realização dos ensaios multiplex de qPCR para a detecção do HTLV-1 e HTLV-2, foram utilizados 10 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X (Promega, EUA), em conjunto com 0,5 µL do Mix HTLV, contendo os iniciadores e sondas específicas para os genes *POL* e *TAX*, previamente preparados separadamente. O volume total da mistura de reação (10,5 µL) foi distribuído em cada poço da placa, seguido da adição de 9,5 µL de DNA extraído (100 ng/µL), resultando em um volume final de 20 µL por poço.

Cada corrida incluiu controles negativo (água livre de nucleases) e positivo (amostras previamente confirmadas para HTLV-1 e HTLV-2 em um mesmo tubo). Após a montagem das reações, a placa foi selada com filme adesivo óptico para PCR. Os protocolos detalhados, incluindo os volumes específicos de cada reagente, estão descritos nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

Tabela 3: Protocolo do volume dos reagentes utilizados para o gene *POL* e albumina para o HTLV-1 e HTLV-2

Reagentes	Volume (µL) por amostra
Água ultrapura q.s.p	0
kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X	10
Mix de primers e sondas HTLV(<i>POL</i>)+ Albumina	0,5
DNA extraído (100 ng/µL)	9,5
Volume final	20

Tabela 4: Protocolo do volume do reagente utilizados para o gene *TAX* e albumina para HTLV-1 e HTLV-2

Reagentes	Volume (µL) por amostra
Água ultrapura q.s.p	0
kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X	10
Mix de primers e sondas HTLV(<i>TAX</i>)+ Albumina	0,5
DNA extraído (100 ng/µL)	9,5
Volume final	20

O modelo de aplicação na placa de qPCR para a detecção do HTLV foi organizado conforme apresentado na Quadro 2. Cada amostra foi distribuída em duas colunas distintas, sendo uma destinada à amplificação do gene *POL* e a outra ao gene *TAX*, permitindo a detecção específica e simultânea de cada alvo molecular, caracterizando o ensaio multiplex.

Quadro 2: Modelo de placa de qPCR para detecção de HTLV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amostra 1 <i>POL + ALB</i>	Amostra 1 <i>TAX + ALB</i>										
B	Amostra 2 <i>POL + ALB</i>	Amostra 2 <i>TAX + ALB</i>										
C	Amostra 3 <i>POL + ALB</i>	Amostra 3 <i>TAX + ALB</i>										
D	Amostra 4 <i>POL + ALB</i>	Amostra 4 <i>TAX + ALB</i>										
E	Amostra 5 <i>POL + ALB</i>	Amostra 5 <i>TAX + ALB</i>										
F	Amostra 6 <i>POL + ALB</i>	Amostra 6 <i>TAX + ALB</i>										
G	CN <i>POL + ALB</i>	CN <i>TAX + ALB</i>										
H	CP <i>POL + ALB</i>	CP <i>TAX + ALB</i>										

Para a detecção do HTLV-1, as sondas específicas para os genes *POL* e *TAX* foram marcadas com o corante repórter FAM. Já para a detecção do HTLV-2, foi utilizado o corante Cy5, garantindo a discriminação entre os dois tipos virais. Além disso, para o controle endógeno da reação, correspondente ao gene da albumina, foi empregada uma sonda marcada com o corante HEX, permitindo analisar a integridade do DNA extraído e da eficiência da reação de qPCR, conforme descrito no Quadro 3 abaixo⁸⁰.

Quadro 3: Sondas utilizadas para cada gene

Sondas	Gene
FAM	Pol_HTLV1
FAM	Tax_HTLV1
Cy5	Pol_HTLV2
Cy5	Tax_HTLV2
HEX	Albumina

Legenda: FAM, 6-carboxy-fluorescein; CY5, cyanine dye; HEX, phosphoramidite dye.

As reações de amplificação foram conduzidas utilizando o termociclador CFX Opus Real-Time PCR System (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 50 ciclos de amplificação, consistindo em desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. A análise dos dados foi realizada por meio do *software* Bio-Rad CFX Manager v2.3 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.6 SEQUENCIAMENTO

Após a amplificação do DNA por qPCR, as amostras que apresentaram resultado detectado foram submetidas ao sequenciamento Sanger. Isso permitiu a confirmação dos resultados obtidos, garantindo a eficiência do processo de amplificação na diferenciação dos subtipos virais HTLV-1 e HTLV-2.

Para o sequenciamento das amostras positivas para HTLV-1, inicialmente foi realizada uma reação de PCR convencional, seguida de uma Nested PCR convencional. Essa estratégia permite amplificar o primeiro produto de PCR, aumentando a sensibilidade da detecção do gene *TAX* (região pX) do genoma proviral. Dessa forma, o ensaio completo foi realizado com um conjunto de quatro primers, gerando a amplificação de um fragmento de 1119 pares de bases (pb) ⁸⁶. Os primers utilizados para a detecção do HTLV-1 foram sintetizados pela Exxtend Solução em Oligos (Campinas, São Paulo, Brasil). As seqüências e localizações dos primers estão detalhadas no Quadro 4.

Quadro 4: Primers utilizados no sequenciamento genético do gene *TAX* do HTLV-1

Primer	Sequência (5'-3')	Localização
PXO1_F	TCGAAACAGCCCTGCAGATA	7257–7276
PXO2_R	TGAGCTTATGATTTGTCTTCA	8447–8467
PXI1_F	ATACAAAGTTAACCATGCTT	7274–7293
PXI3_R	AGACGTCAGAGCCTTAGTCT	8374–8393

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*.

Fonte: Furukawa *et al.*, 2000

Os ensaios de PCR convencional foram preparados em um volume final de 25 µL, enquanto os ensaios de Nested PCR convencional foram

realizados em um volume de 50 μL . O protocolo detalhado, com os volumes de cada reagente utilizado, está descrito nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na PCR convencional para o gene TAX do HTLV-1

Reagente	Volume (μL) amostra
H ₂ O	14,05
Buffer 10X	2,50
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,75
dNTP	0,50
PXO1_F_HTLV1 (1 μM)	2,50
PXO2_R_HTLV1 (1 μM)	2,50
Taq Platinum (U)	0,20
DNA	2,00
Volume final	25,00

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*.

Fonte: Adaptado de Furukawa *et al.*, 2000.

Tabela 6: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na Nested da PCR convencional para o gene TAX do HTLV-1

Reagente	Volume (μL) amostra
H ₂ O	31,30
Buffer 10X	5,00
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,50
dNTP	1,00
PXI1_F_HTLV1 (1 μM)	5,00
PXI3_R_HTLV1 (1 μM)	5,00
Taq Platinum (U)	0,20
DNA	1,00
Volume final	50,00

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*.

Fonte: Adaptado de Furukawa *et al.*, 2000.

Para a PCR convencional, foi preparado um mix de reação com volume final de 23 μL , ao qual foram adicionados 2 μL de DNA extraído (100 ng/ μL), totalizando 25 μL por poço. A placa foi devidamente selada e submetida à

primeira PCR, realizada no termociclador Bio - Rad T100 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA), utilizando o seguinte protocolo de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação, consistindo em desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e 15 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. A reação foi finalizada com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Em seguida, 1 µL do produto da primeira PCR foi adicionado na Nested PCR. Essa etapa foi realizada no mesmo termociclador, utilizando a seguinte condição de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de amplificação, consistindo em desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto e 15 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos.

Para o sequenciamento do HTLV-2, foi realizada a amplificação do DNA por PCR convencional. Os primers específicos para o HTLV-2 foram adquiridos da empresa *Integrated DNA Technologies (IDT)*. O ensaio utilizou um par de primers, resultando na amplificação de um fragmento de 623 pares de bases (pb)⁸⁷, cujas sequências e localizações estão descritas no Quadro 5.

Quadro 5: Primers utilizados no sequenciamento genético do gene TAX do HTLV-2

Primer	Sequência (5'-3')	Localização
PX105_F	GCTTCCCCACCCATGACATG	7683 - 7703
PX106_R	GGGCCGTGGTTTCAGTTCCTA	8326 - 8306

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*.

Fonte: Adaptado de Eiraku *et al.*, 1996.

Os ensaios de PCR foram preparados em um volume final de 25 µL. O protocolo detalhado, incluindo os volumes de cada reagente utilizado, está descrito na Tabela 7.

Tabela 7: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na PCR para o gene *TAX* do HTLV-2

Reagente	Volume (µL) amostra
H ₂ O	13,74
Buffer 10X	2,50
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,00
dNTP	0,56
PX105_F_HTLV2 (1 µM)	2,50
PX106_R_HTLV2 (1 µM)	2,50
Taq Platinum (U)	0,20
DNA	2,00
Volume final	25,00

Legenda: F, Forward; R, Reverse; Pb, Probe.

Fonte: Adaptado de Eiraku *et al.*, 1996.

A placa foi devidamente selada e submetida à primeira PCR, realizada no termociclador Bio - Rad T100 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA), utilizando o seguinte protocolo de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação, consistindo em desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 50 segundos. A reação foi finalizada com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após a realização da Nested da PCR para o HTLV-1 e a PCR para o HTLV-2, alíquotas de 10 µL dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1% (0,3 gramas de agarose em 30 mL de tampão TAE 1x). O gel foi corado com 3 µL de Gel Red (GelRed ® Nucleic Acid e Gel Loading Buffers) e acrescido de 4 µL do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen- Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada com uma corrente de 90V por 45 minutos, utilizando o mesmo tampão TAE 1x (0,04M Tris acetato e 1 mM de EDTA) como solução de corrida. Os resultados foram visualizados sob à luz ultravioleta em um transluminador Gel Doc Go imaging System (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de purificação utilizando o kit Exo-SAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), utilizando 5 µL do produto de PCR e 8 µL da solução ExoSAP-IT, sendo incubada a 37°C por 15 minutos, e em seguida, foi inativada a 80°C por 15 minutos. Em seguida, os produtos foram quantificados em NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e diluído para obter uma concentração entre 30 e 50 ng/ µL. Para a etapa subsequente, cada amostra foi dividida em dois tubos, um destinado à reação com o primer *forward* e outro com o primer *reverse*, aos quais foram adicionados os respectivos primers utilizados na PCR.

As amostras foram enviadas a UNIPLEX (Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu), no qual foi realizado o Sequenciamento Sanger.

Os arquivos obtidos do sequenciamento foram analisados pelo programa Chromas 2.6.6 (Technelium Pty Ltd, Austrália), e foi checado para confirmar se todas as sequências eram de HTLV usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no website do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que compara cada sequência com todo o banco de dados do NCBI.

3.7 PLASMÍDEO E A CONSTRUÇÃO DA CURVA

A construção da curva padrão foi realizada por meio de diluições seriadas a partir de um plasmídeo. Para esse fim, foi sintetizado comercialmente um plasmídeo contendo a sequência *pol_taxHTLV1HTLV2alb* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), foi construído entre as posições de dois sítios Sfil (361-1395 bp), e com fragmento de 3355 bp.

Apesar de tratar-se de um plasmídeo comercial, a quantificação inicial mostrou concentração insuficiente para os testes de validação. Por esse motivo, foi necessário realizar parte do processo de clonagem para amplificar o plasmídeo em questão.

A preparação do plasmídeo iniciou-se com a transformação bacteriana por eletroporação da Gene Pulser X cell CE Module (Bio - Rad) em *Escherichia*

coli DH5 α em meio Luria Bertani (LB) contendo 0,2 mg/mL de ampicilina, seguindo o protocolo recomendado para o método. Posteriormente, foi realizada a minipreparação (miniprep), seguida da quantificação do DNA plasmidial por meio do fluorômetro Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, California, US).

Em seguida, foi realizada a preparação do plasmídeo que incluiu uma etapa de digestão enzimática com uma enzima de restrição. A reação de digestão foi composta por 12,5 μ L do DNA plasmidial, 5 μ L do 10x NEB CutSmart® Buffer (New England BioLabs , Ipswich , MA , EUA), 1 μ L de enzima SfiI (10 U/ μ L, New England BioLabs , Ipswich , MA , EUA), e 31,5 μ L de água livre de nucleases (nuclease-free H₂O), totalizando 50 μ L. A mistura foi incubada a 50°C por 3 minutos em termociclador (Bio - Rad T100, Bio-Rad).

Após a digestão, o DNA foi purificado por extração de fenol-clorofórmio seguida de precipitação com etanol ⁸⁸. As amostras purificadas foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red® (Biotium), utilizando o marcador 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Beverly, Mass). A corrida eletroforética foi a 90V por 45 minutos com tampão TAE 1x (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). Os produtos de amplificação foram visualizados sob à luz UV em um transluminador Gel Doc Go(Bio-Rad).

As bandas correspondentes a aproximadamente 1200 pares de bases (pb), foram cortadas com o auxílio de bisturi estéril e transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. A purificação do DNA foi realizado usando o GFX™ PCR DNA e o Gel Band Purification Kit (Cytiva). Por fim, a quantificação das amostras foi realizada com o fluorômetro Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, California, US).

Após a quantificação da amostra, foram realizados os cálculos necessários para a construção da curva padrão com base em diluições seriadas. A partir da média das quantificações realizadas em duplicata e utilizando a fórmula de número de cópias / μ L (Thermo Fisher Scientific), foi estimada uma concentração de $6,35 \times 10^7$ cópias/ μ L na solução estoque de DNA plasmidial. Em seguida, foram preparadas diluições sucessivas na proporção de 1:10, resultando nas seguintes concentrações: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 cópias/ μ L. Cada ponto de diluição foi testado em nove réplicas

por placa, sendo uma placa destinada à amplificação do gene *POL* e outra ao gene *TAX*.

Esses ensaios tiveram como objetivo a determinação o primeiro limite de detecção do ensaio (LOD 1). O LOD é a menor quantidade de cópias de DNA detectáveis, em 95% das amostras detectáveis ⁸⁹. A partir da última diluição com detecção positiva, foram preparadas diluições adicionais em fator 1:2 a partir do ponto de 10^2 (100 cópias), resultando em concentrações de 50 cópias, 25 cópias e 12,5 cópias/ μ L. Para a determinação do segundo limite de detecção (LOD 2), cada uma dessas diluições foi testada em 20 réplicas por ponto, para cada gene (*POL* e *TAX*), totalizando 80 reações por gene.

A validação qPCR multiplex usando plasmídeos, para a detecção de HTLV-1 e HTLV-2 (*POL* e *TAX*) foram analisados no software Bio-Rad CFX Manager v2.3 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.8 ENSAIO DE PRECISÃO

O ensaio de precisão foi realizado utilizando o plasmídeo, permitindo a detecção simultânea dos alvos HTLV-1/2_*pol* e HTLV-1/2_*tax* na mesma placa de PCR. Para a definição das diluições a serem utilizadas, foi conduzido inicialmente um ensaio preliminar de repetibilidade, aplicando as seguintes concentrações: 10^4 , 10^3 , 500, 100, 80, 60, 40 e 20 cópias. A partir da análise dos valores de Ct (*Cycle Threshold*), foram selecionadas diluições que representassem diferentes faixas de carga viral, classificadas como Ct alto, médio, baixo e escasso. Considerando que o valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de cópias do DNA alvo ⁹⁰, a categorização seguiu os seguintes intervalos: Ct < 30 (alta carga), Ct entre 31–35 (média), Ct entre 36–37 (baixa), e Ct entre 38–40 (escassa).

Dessa forma, foram selecionadas diluições que correspondessem aos intervalos de Ct. Cada diluição foi aplicada em oito réplicas para cada gene (*POL* e *TAX*).

O ensaio foi conduzido por três analistas diferentes, utilizando três equipamentos, avaliando, assim, as precisões inter-ensaios, medindo a reprodutibilidade do teste.

3.9 ENSAIO DE MATRIZ

O estudo de matriz tem como objetivo avaliar a interferência dos componentes da amostra na amplificação no qPCR, impactando a eficiência da reação ⁹¹.

Para a realização do ensaio de matriz, foram utilizadas amostras previamente testadas como negativas para o HTLV por qPCR. O ensaio foi conduzido em uma placa de PCR dividida em duas metades: em uma metade, foi adicionado tampão TE 1X (Tris-EDTA) contendo DNA plasmidial, servindo como controle; na outra metade, utilizou-se DNA das amostras negativas para HTLV, também com DNA plasmidial adicionado.

A partir do DNA plasmidial, foram realizadas diluições seriadas na razão de 1:10, obtendo-se as seguintes concentrações de DNA plasmidial: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias. Cada ponto de diluição foi testado em doze réplicas por placa, sendo seis réplicas para o controle e seis para a matriz. O experimento foi realizado em duas placas distintas, sendo uma para à amplificação do gene *POL* e a outra ao gene *TAX*. Ao final, foi comparado os resultados obtidos do TE e com a matriz.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os cálculos de média, desvio padrão, variância, coeficiente de variação foram utilizados o Microsoft Excel 2010.

Para o cálculo amostral inicial, foi utilizada a fórmula do intervalo de confiança para uma proporção, considerando-se a prevalência de 5,3% do HTLV, uma margem de erro de 5% e uma confiabilidade de 95%, resultando em um tamanho amostral mínimo de 75 pacientes.

4. RESULTADOS

4.1 SENSIBILIDADE ANALÍTICA: LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO (LOD) DA qPCR

O ensaio de limite de detecção foi realizado com o plasmídeo contendo 5 alvos (TAX-HTLV1, TAX-HTLV2, POL-HTLV1, POL-HTLV2, ALB). Primeiramente foi realizado um ensaio preliminar com curva de diluição de fator 10, contendo 10^6 a 1 cópia/5 μ L. O último ponto em que todas as amostras foram positivas foi utilizado em um segundo ensaio, de diluição de fator 2 com 20 replicatas. A sensibilidade de (LoD) de 100 moléculas foi determinada para os alvos (POL-HTLV1 e POL-HTLV2) e de 25 moléculas (TAX-HTLV1, TAX-HTLV2). Os intervalos de valores de Ct para cada alvo nos pontos de cópias aproximadas de 100, 50, 25 e 12,5 estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Determinação dos limites de detecção (LOD) para gene

POL 1			POL 2		TAX 1		TAX 2	
Cópias/reação	Int. de Ct	NºDetec.	Int. de Ct	NºDetec.	Int. de Ct	NºDetec.	Int. de Ct	NºDetec.
100	34.41- 36.86	20/20	36.59 - 39.08	20/20	33.69 - 34.85	20/20	33.44 - 34.82	20/20
50	35.39 - 40.82	17/20	37.29 - 41.06	18/20	34.74 - 36.46	20/20	34.36 - 35.77	20/20
25	36.36 - 38.28	9/20	39.10 - 40.37	8/20	35.64 - 39.25	20/20	35.74 - 39.29	20/20
12,5	37.06 - 38.50	4/20	39.49 - 40.06	4/20	36.86 - 39.97	15/20	36.40 - 39.31	15/20

Legenda: Int. de Ct- Intervalo de Ct; NºDetec.- Número de detecção.

O limite de detecção para o alvo *POL* foi estabelecido em 100 cópias por reação, com detecção em 100% das replicatas testadas. Para o gene *TAX*, o limite foi de 25 cópias por reação, também com 100% de detecção nas replicatas. Esses resultados indicam uma maior sensibilidade da reação para o gene *TAX*.

A construção da curva permitiu a determinação da eficácia do ensaio, a linearidade e o coeficiente de correlação (R^2). Os dados foram analisados no software Bio-Rad CFX Manager v2.3(Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os parâmetros de slope, R^2 e eficiência foram analisados para os alvos *POL 1*, *POL 2*, *TAX 1* e *TAX 2*, os resultados estão descritos na Tabela 9.

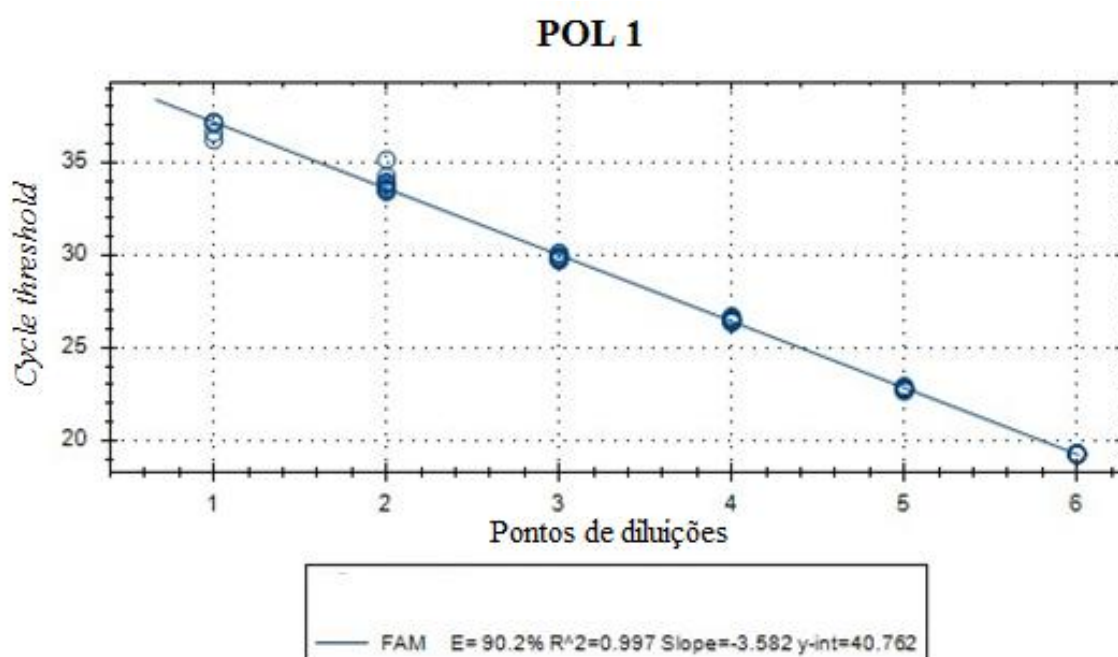
Tabela 9: Os parâmetros para cada alvo

	HTLV1		HTLV2	
	POL	TAX	POL	TAX
Slope	- 3,58	-3.638	- 3.471	-3.63
R²	0.997	0.996	0.995	-0.997
Eficiência	90.2%	88.3%	94.1%	88.6%

Legenda: R² - Coeficiente de determinação

O ensaio para o alvo POL 1 obteve uma eficiência de 90,2%, *slope* de – 3,58 e R² 0,997 (Figura 5).

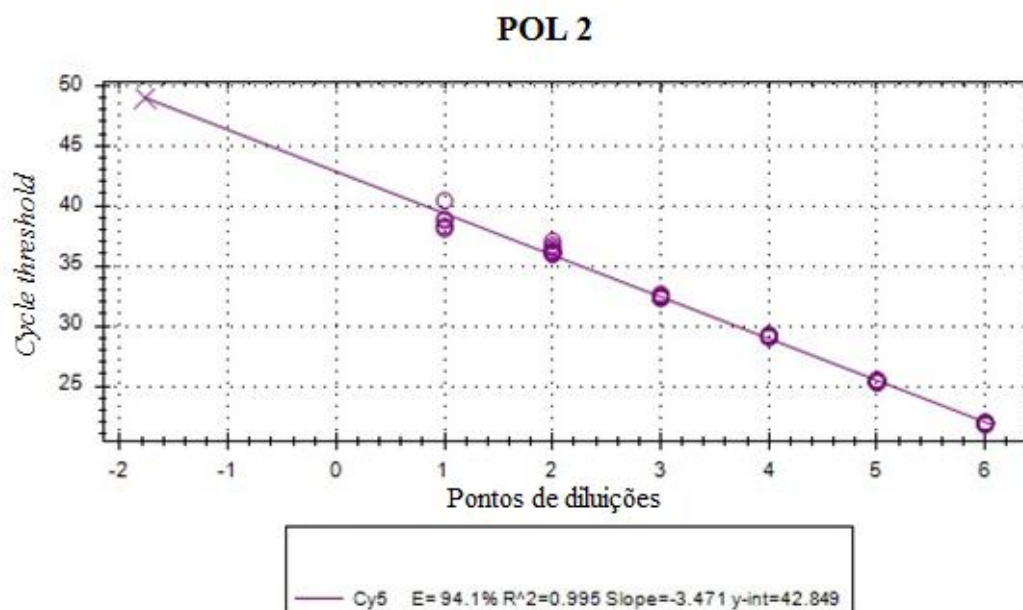
Figura 5: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R² e eficiência da reação, com o alvo POL 1



Legenda: FAM- 6-carboxy-fluorescein; E-eficiência da reação (Efficiency= $10^{(-1/\text{slope})}$); R²- coeficiente de determinação; y=int- y intercept.

Para o alvo POL 2 obteve uma eficiência de 94,1%, *slope* de – 3,471 e R² 0,995 (Figura 6).

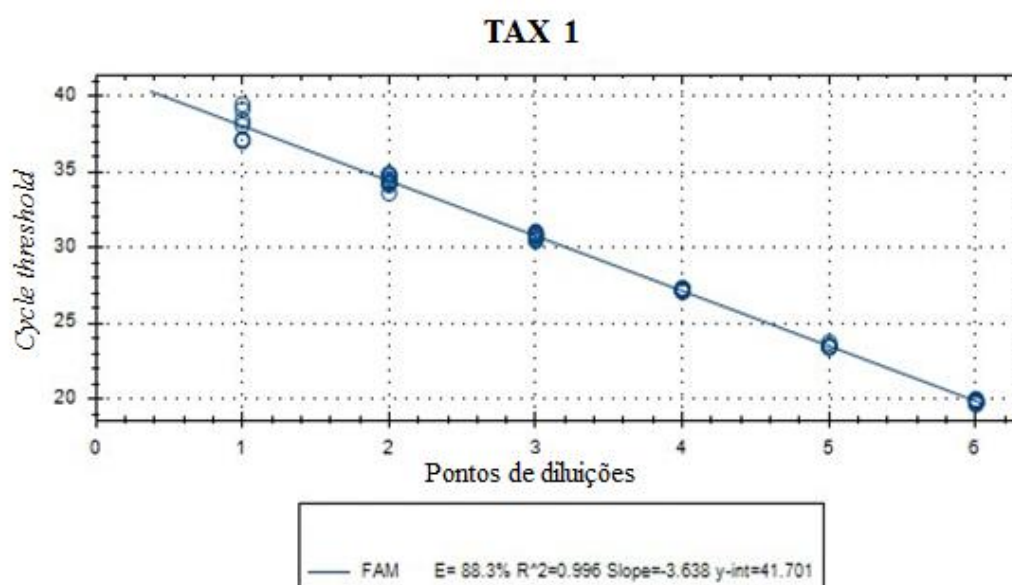
Figura 6: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo *POL 2*



Legenda: CY5-cyanine dye; E-eficiência da reação ($Efficiency=10^{(-1/slope)}$); R^2 - coeficiente de determinação; y=int- y intercept.

Para o alvo TAX 1 obteve uma eficiência de 88,3%, *slope* de – 3,638 e R^2 0,996 (Figura 7).

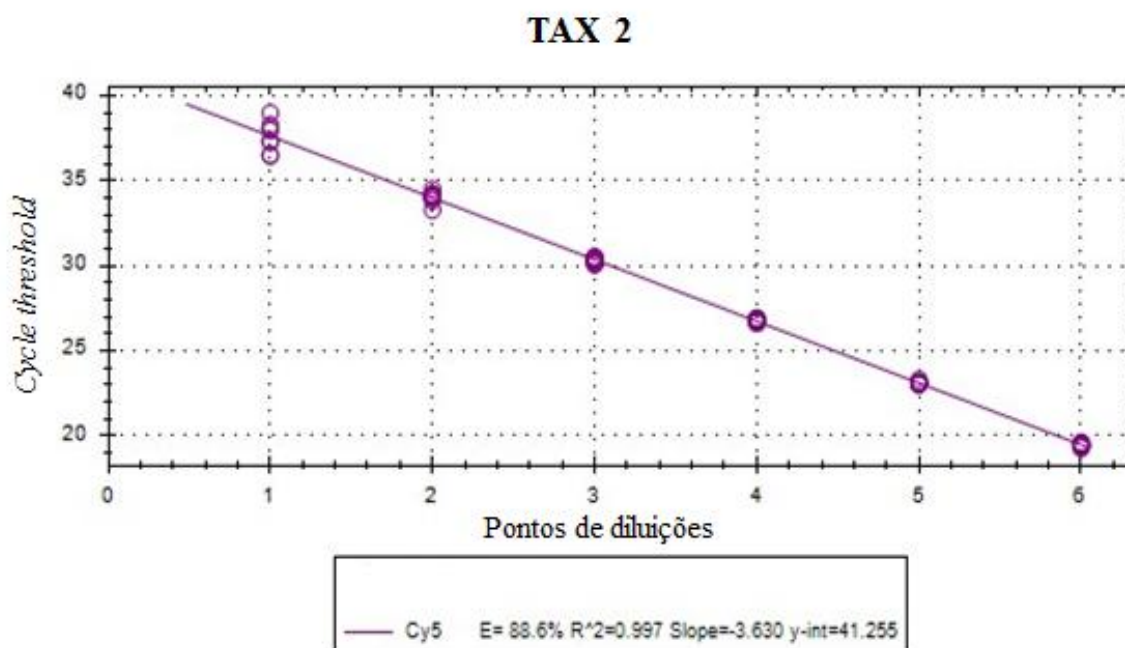
Figura 7: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo *TAX 1*



Legenda: FAM- 6-carboxy-fluorescein; E-eficiência da reação ($Efficiency=10^{(-1/slope)}$); R^2 - coeficiente de determinação; y=int- y intercept.

Para o alvo TAX 2 obteve uma eficiência de 88,6%, slope de – 3,63 e R^2 0,997 (Figura 8).

Figura 8: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo TAX 2



Legenda: CY5-cyanine dye; E-eficiência da reação ($Efficiency=10^{(-1/slope)}$); R^2 - coeficiente de determinação; y=int- y intercept.

4.2 PRECISÃO

Para o teste de precisão foram selecionados pontos de diluição do plasmídeo correspondentes a quatro categorias de valores de Ct: alto ($Ct \leq 30$), médio ($Ct 31-35$), baixo ($Ct 36-37$) e escasso ($38-40$). Foram realizadas 8 replicatas de cada ponto e três corridas diferentes. Foram avaliadas métricas de repetibilidade (dentro de uma mesma corrida) e reprodutibilidade (entre corridas diferentes). Os resultados encontrados estão listados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) em diferentes faixas de concentrações de DNA proviral para HTLV-1.

HTLV1														
POL								TAX						
	Ct			Média	DP	VAR	CV(%)	Ct			Média	DP	VAR	CV(%)
	1.	2.	3.					1.	2.	3.				
Alto	24,21	24,21	24,06	24,24	0,13	0,02	0,52	24,38	24,39	24,30	24,32	0,12	0,01	0,50
	24,14	24,27	24,15					24,29	24,34	24,27				
	24,18	24,31	24,09					24,30	24,29	24,17				
	24,16	24,24	24,09					24,24	24,36	24,17				
	24,24	24,20	24,15					24,27	24,33	24,20				
	24,09	24,34	24,34					24,25	24,46	24,17				
	24,22	24,49	24,44					24,28	24,52	24,13				
	24,28	24,52	24,41					24,38	24,67	24,41				
Médio	32,10	31,93	32,04	32,08	0,12	0,01	0,38	32,14	32,57	32,30	32,27	0,19	0,04	0,60
	32,08	31,92	32,01					31,76	32,18	32,46				
	32,22	32,22	32,01					32,06	32,26	32,32				
	31,80	32,04	32,23					32,13	32,53	32,32				
	32,07	31,98	32,10					32,06	32,01	32,36				
	32,04	32,09	32,14					32,06	32,47	32,39				
	32,03	32,12	32,18					32,27	32,37	32,15				
	32,12	32,01	32,38					32,48	32,40	32,32				
Baixo	36,13	35,52	38,51	36,33	0,92	0,84	2,52	35,98	36,43	36,22	36,67	0,87	0,76	2,38
	36,63	36,99	35,51					36,51	37,61	36,75				
	36,05	35,87	36,91					N/A	37,57	37,15				
	35,83	35,27	38,22					36,05	35,42	36,55				
	35,66	35,68	N/A					36,08	36,73	36,42				
	35,62	36,02	37,30					37,16	35,29	35,94				
	37,44	35,71	35,33					39,10	36,48	37,74				
	36,21	N/A	36,93					36,28	37,90	36,15				
Escasso	36,85	36,34	38,23	37,11	0,91	0,83	2,45	38,91	38,06	36,41	37,93	1,89	3,59	4,99
	37,16	36,56	36,78					38,99	36,38	N/A				
	35,92	37,21	N/A					37,11	37,75	43,60				
	38,29	37,12	37,35					37,11	37,53	38,66				
	35,50	36,14	37,29					36,91	37,67	38,15				
	38,15	37,19	38,21					36,66	37,45	36,36				
	36,11	36,20	37,04					35,60	36,03	41,54				
	37,51	37,37	39,17					N/A	37,19	40,41				

Legenda: Ct- *cycle threshold* ; DP- desvio padrão; VAR- variância; CV(%) - coeficiente de variância.

Tabela 11: Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) em diferentes faixas de concentrações de DNA proviral para HTLV-2.

HTLV2														
POL								TAX						
	Ct			Média	DP	VAR	CV(%)	Ct	Média			DP	VAR	CV(%)
	1.	2.	3.						1.	2.	3.			
Alto	27,02	26,89	26,73	26,99	0,14	0,02	0,51	24,20	24,03	23,89	23,97	0,18	0,03	0,74
	27,02	26,88	26,78					24,14	23,93	23,75				
	27,05	26,96	26,84					24,13	23,89	23,74				
	27,04	26,99	26,78					24,12	23,91	23,73				
	27,03	26,86	26,86					24,05	23,99	23,73				
	26,99	27,03	27,05					24,06	24,06	23,70				
	27,09	27,21	27,21					24,09	24,06	23,61				
	27,18	27,16	27,16					24,20	24,20	24,00				
Médio	34,73	34,14	34,53	34,64	0,24	0,06	0,71	31,75	31,96	31,88	31,82	0,13	0,02	0,41
	34,70	34,27	34,57					31,64	31,70	31,85				
	35,02	34,66	34,58					31,96	31,85	31,74				
	34,74	34,22	34,78					31,93	31,89	31,79				
	34,84	34,34	34,56					31,63	31,61	31,87				
	34,70	34,42	34,60					31,80	31,80	31,82				
	34,81	34,69	34,92					32,06	31,65	31,70				
	35,00	34,59	35,05					32,09	31,80	31,96				
Baixo	38,51	37,75	N/A	38,48	0,83	0,69	2,16	36,53	36,72	35,13	36,21	1,00	1,01	2,77
	39,24	38,23	38,64					36,01	36,69	36,26				
	38,16	37,10	38,85					39,10	36,48	35,05				
	37,86	37,13	39,71					35,74	34,72	35,50				
	38,39	38,59	40,18					36,47	37,10	36,19				
	38,28	38,11	40,03					37,24	35,11	35,08				
	38,76	37,49	37,85					38,04	36,08	36,58				
	39,20	N/A	38,58					36,12	35,70	35,52				
Escasso	38,37	38,17	38,99	38,93	0,84	0,70	2,16	37,63	37,10	35,94	37,03	1,00	0,99	2,69
	38,74	39,38	40,23					39,12	36,45	N/A				
	38,69	36,69	N/A					36,22	37,85	36,14				
	40,28	38,50	N/A					36,88	35,86	38,82				
	38,32	38,34	40,31					36,60	37,07	37,72				
	39,58	N/A	38,69					36,45	37,31	36,28				
	39,00	38,37	38,77					36,12	35,86	38,78				
	39,15	39,64	39,35					N/A	36,60	37,89				

Legenda: Ct- *cycle threshold* ; DP- desvio padrão; VAR- variância; CV(%) - coeficiente de variância.

4.3 ENSAIO DE MATRIZ

O ensaio de matriz avaliou possíveis interferências de componentes da matriz de amostras negativas para HTLV na amplificação dos alvos *POL* e *TAX*, por meio da comparação com o controle contendo apenas tampão TE 1X. Foram realizadas diluições seriadas, sendo que cada ponto foi testado em doze réplicas por placa, seis com tampão TE (controle) e seis com matriz (DNA de amostras negativas para HTLV), sendo uma placa para cada gene *POL* e *TAX*.

A partir dos valores de Ct obtidos, foram calculadas a média, o desvio padrão (DP), a variância e o coeficiente de variação (CV%) para cada ponto de diluição, permitindo a comparação entre o desempenho da reação nas diferentes condições. Os resultados estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados do ensaio de matriz: comparação entre controle (TE) e matriz (amostras negativas para HTLV)

HTLV1										HTLV2									
TE					MATRIZ					TE					MATRIZ				
	Cópias/ 5µL	M	DP	VAR	CV(%)	M	DP	VAR	CV(%)	M	DP	VAR	CV(%)		M	DP	VAR	CV(%)	
POL	1000000	18,97	0,05	0,00	0,25	18,57	0,09	0,01	0,47	21,51	0,09	0,01	0,41		21,20	0,06	0,00	0,30	
	100000	22,46	0,08	0,01	0,37	21,98	0,04	0,00	0,19	25,10	0,06	0,00	0,26		21,51	0,04	0,00	0,20	
	10000	26,13	0,05	0,00	0,18	25,30	0,06	0,00	0,25	28,70	0,10	0,01	0,34		27,86	0,11	0,01	0,38	
	1000	29,68	0,18	0,03	0,62	28,67	0,14	0,02	0,47	32,26	0,16	0,02	0,48		31,22	0,10	0,01	0,30	
	100	33,29	0,36	0,13	1,09	32,21	0,24	0,06	0,74	35,97	0,45	0,20	1,24		34,36	0,22	0,05	0,65	
	10	37,00	0,71	0,51	1,92	35,64	0,40	0,16	1,13	36,69	0,70	0,49	1,76		37,60	0,32	0,10	0,84	
TAX	1000000	19,39	0,12	0,02	0,63	19,27	0,03	0,00	0,15	19,03	0,11	0,01	0,57		18,93	0,04	0,00	0,20	
	100000	22,86	0,16	0,03	0,72	22,66	0,11	0,01	0,47	22,39	0,15	0,02	0,68		22,23	0,08	0,01	0,35	
	10000	26,30	0,12	0,01	0,44	26,07	0,09	0,01	0,36	25,88	0,13	0,02	0,49		25,57	0,11	0,01	0,43	
	1000	29,79	0,10	0,01	0,32	29,37	0,11	0,01	0,37	29,31	0,14	0,02	0,49		28,90	0,10	0,01	0,36	
	100	33,13	0,24	0,06	0,72	32,93	0,27	0,08	0,83	32,59	0,15	0,02	0,47		32,28	0,20	0,04	0,62	
	10	36,59	0,95	0,90	2,60	36,48	1,05	1,11	2,89	36,19	1,06	1,13	2,93		35,95	1,49	2,21	4,13	

Legenda: M- média do Ct (*cycle threshold*) ; DP- desvio padrão; VAR- variância; CV(%) - coeficiente de variância

Os resultados foram analisados no software Bio-Rad CFX Manager v2.3 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA), determinando os valores de eficiência, slope e R^2 foram analisados para os alvos *POL* 1, *POL* 2, *TAX* 1 e *TAX* 2 em comparação ao controle (TE) e a matriz, os resultados estão descritos nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13: Valores de eficiência, slope e R^2 para o gene *POL*

	TE		MATRIZ	
	POL 1	POL 2	POL 1	POL 2
Slope	- 3,606	-3,631	- 3.41	-3.278
R²	0.997	0.997	0.999	-0.999
Eficiência	89,4%	88,6%	96,4%	101,9%

Legenda: R^2 - Coeficiente de determinação

Tabela 14: Valores de eficiência, slope e R^2 para o gene TAX

	TE		MATRIZ	
	TAX 1	TAX 2	TAX 1	TAX 2
Slope	- 3,436	-3,424	- 3.433	-3.388
R²	0.996	0.995	0.995	-0.99
Eficiência	95,5%	95,9%	95,6%	97,3%

Legenda: R^2 - Coeficiente de determinação

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

As amostras foram consideradas detectadas quando apresentaram amplificação simultânea para ambos os alvos moleculares (FAM e Cy5). Amostras que apresentaram amplificação para apenas um dos alvos foram classificadas como inconclusivas, sendo indicada a solicitação de nova coleta para repetição da análise.

4.4.1 Grupo 1

A população incluída nesse grupo foi composta por 13 amostras do Ambulatório de Infectologia do HCFMB, sendo 9 (70%) do sexo feminino e 4 (30%) do sexo masculino. A idade média foi de 43,6 anos ($\pm 18,1$), variando de 18 a 79 anos. A qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado detectado em 40% (n=4) das amostras e não detectado em 60% (n=9). Aqui os pacientes foram procedentes de Avaré, Botucatu, Itatinga, Pardinho, Porangaba, Taquarituba.

4.4.2 Grupo 2

A população incluída nesse grupo foi composta por 75 amostras de doadores de sangue, sendo 47 (62%) do sexo masculino e 28 (38%) do sexo feminino. A idade média foi de 39 anos ($\pm 12,3$), variando de 19 a 64 anos. A procedência dos pacientes foi de Botucatu (42%), Avaré (13%), São Manuel (12%), Conchas (5%) e outras localidades (28%). A qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado não detectado em 75 amostras. Todos foram não reagentes também pelo ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories),

mostrando 100% de especificidade no teste molecular. No período em que as amostras foram coletadas não houve doadores de sangue reagentes para HTLV pelo teste sorológico.

4.4.3 Grupo 3

A população incluída nesse grupo foi composta por 57 amostras de amostras de pacientes com diagnóstico positivo para HIV, sendo 18 (31%) do sexo feminino e 39 (69)% do sexo masculino. A idade média foi de 38,6 anos ($\pm 12,8$), variando de 20 a 63 anos. Os pacientes são procedentes de Botucatu (32%), Piraju (11%) e outras localidades (57%). Outras características dos pacientes seguem descritas na Tabela 15. A qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado não detectado em 54 amostras, e 3 amostras como detectado (prevalência de 5,2%). Dessas 54 amostras negativas pelo HTLV por qPCR_HTLV1/2, 45 amostras foram testadas também pelo ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories), sendo que 44 amostras (n=44) foram concordante com o resultado do ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories), ou seja uma concordância de 97,7% e apenas uma amostra (n=1) foi detectada pelo ensaio de quimioluminescência e não pelo qPCR_HTLV1/2.

Tabela 15: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes do grupo 3

Variável	Categoria	n(%)
Sexo	Masculino/Feminino	39 (69)/ 18 (31)
Idade (anos)	Média $\pm$ DP (variação)	38,6 $\pm$ 12,8 (20- 63)
Tempo de diagnóstico do HIV	< 5 anos/ $\geq$ 5 anos	54 (95) / 3 (5)
Grupo de risco	Múltiplos parceiros/ Usuário de drogas/ Parceiro HIV+/ Sem risco descrito	18 (32)/14(24)/ 7(12)/ 18(32)
Infecções oportunistas	Sífilis/Tuberculose/Toxoplasmose/Sem infecções descritas	13(24)/6(9)/4(7)/ 34(60)

Legenda: DP- desvio padrão; n (%) - número absoluto de paciente (proporção em porcentagem do total de amostras).

4.4.4 Grupo 4

Foram incluídos 40 amostras de pacientes coinfectados com HIV e/ou HBV e/ou HCV, sendo 9 (20%) do sexo feminino e 31 (80)% do sexo masculino. A idade média foi de 51 anos ($\pm 8,08$), variando de 25 a 66 anos. Os pacientes procedem de Botucatu (49%), Lençóis Paulista (8%) e outros municípios (43%). Outras características dos pacientes seguem descritas na Tabela 16. A qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado não detectado em 37 das amostras e 3 amostras foram detectadas para HTLV-2 (prevalência de 7,5%) (sendo HIV/HCV/HBV/HTLV-2 n=2, HIV/HCV/HTLV-2 n=1).

Tabela 16: Característica clínicas e epidemiológicas dos pacientes do grupo 4

Variável	Categoria	n(%)
Sexo	Masculino/Feminino	31 (80)/ 9 (20)
Idade (anos)	Média $\pm$ DP (variação)	51 $\pm$ 8,08(25- 66)
Tempo de diagnóstico do HIV	< 5 anos/ $\geq$ 5 anos	1(3)/ 39 (97)
Grupo de risco	Múltiplos parceiros/ Usuário de drogas/ Parceiro HIV+/ Sem outros riscos descritos	5 (11)/12(30)/ 2(5)/ 21(54)
Infecções oportunistas	Sífilis /Toxoplasmose/Tuberculose/Sem infecções descritas	14(36)/3(5)/1(3)/22(56)
Uso de TARV	Sim/Não	40 (100)/ 0 (0)
Confeções	HBV/HCV/Ambos	13(34)/22(56)/5(10)

Legenda: DP- desvio padrão; n (%) - número absoluto de paciente (proporção em porcentagem do total de amostras).

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular é amplamente empregado na detecção de agentes infecciosos, e tem sido incorporado como rotina diagnóstica pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil. No contexto da infecção pelo HTLV, os testes moleculares tornaram-se essenciais, especialmente como método confirmatório para amostras com resultados detectados ou inconclusivos em triagens sorológicas, e para a diferenciação entre os subtipos virais. No entanto, a escassez de testes moleculares comerciais disponíveis, pelo alto custo ou pela ausência de testes que atendam a demandas locais, o desenvolvimento de ensaios moleculares é realizado por laboratórios clínicos ou de pesquisa. Esses testes, denominados *in house*, normalmente são desenvolvidos e utilizados exclusivamente pelo laboratório desenvolvedor, não sendo disponibilizados comercialmente para outros laboratórios. Porém, ao desenvolver um novo teste *in house* é necessário realizar o processo de validação, sendo avaliadas: sensibilidade analítica (limite de detecção), sensibilidade diagnóstica, repetibilidade, reprodutibilidade, conforme descrito pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 786/2023 da Anvisa^{73, 80, 92, 93, 94}.

O diagnóstico molecular do HTLV-1/2 ainda apresenta uma ausência de padronização tanto em relação às regiões do segmento do genoma e aos *primers* utilizados, quanto aos critérios adotados para a definição de uma amostra como detectada^{1, 95, 96}.

Neste trabalho, os ensaios de validação foram realizados com o uso de um plasmídeo comercial, em vez de amostras biológicas dos pacientes. Essa medida foi adotada devido à baixa disponibilidade e quantidade limitada de amostras biológicas dos pacientes.

No entanto, o uso de plasmídeos a depender do ensaio de validação pode não refletir as variáveis e os constituintes biológicos presentes nas amostras clínicas. Neste estudo, foi utilizado um único plasmídeo sintetizado comercialmente, contendo as seguintes regiões-alvo: *POL 1*, *POL 2*, *TAX 1*, *TAX 2* e albumina. Para a validação do ensaio, foram utilizados dois segmentos do genoma proviral, *POL* e *TAX*, ambos para HTLV-1 e HTLV-2. A detecção foi realizada com sondas marcadas com fluoróforos a seguir: FAM para HTLV-1,

CY5 para HTLV-2 e HEX para o gene da albumina, utilizado como controle endógeno⁸⁰.

Para ensaios qualitativos a determinação do limite mínimo de detecção (LOD) não é obrigatória, contudo, é recomendada por determinar a sensibilidade do teste, sendo uma etapa importante para validação do ensaio, que visa confirmar por meio de evidências documentadas, que os requisitos previamente estabelecidos para o uso do analito foram atendidos⁹². Na construção da curva do LOD, as diluições foram realizadas no dia da reação, para evitar possíveis degradações e a interferência externas nos resultados.

O LOD é a menor quantidade de DNA detectado, em $\geq 95\%$ das repetições⁹⁷. Para gene *POL* foi estabelecido em 100 cópias por reação, com detecção em 100% das replicatas testadas. Para o gene *TAX*, o limite foi de 25 cópias por reação, também com 100% de detecção nas replicatas. Esses resultados indicam uma maior sensibilidade da reação para o gene *TAX*.

Entretanto, outros estudos que empregaram qPCR para a detecção do HTLV-1/2 relataram maior sensibilidade em comparação ao presente estudo. Em Naderi⁽⁹⁸⁾, foi detectado uma carga proviral de HTLV-1 em amostras de sangue total, com um limite de detecção variando entre 1 e 10 cópias por reação.

Estes e Sevall⁽⁹⁹⁾ empregaram a β -globina como controle endógeno em um ensaio que utilizou o gene *TAX* para a detecção do HTLV-1 e a região 5'LTR para o HTLV-2, com limite de detecção de 60 cópias por reação.

Besson e Kazanji⁽¹⁰⁰⁾ desenvolveram um ensaio multiplex de qPCR para a detecção do HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3, utilizando o gene da albumina como controle endógeno, o ensaio apresentou um limite de detecção variando entre 1 e 10 cópias por reação. Resultados parecidos ao encontrados por Waters⁽¹⁰¹⁾, que desenvolveram um ensaio tríplex ao gene *POL* para o HTLV-1 e ao gene *TAX* para o HTLV-2, encontrando uma sensibilidade de 1 a 10 cópias por reação.

No estudo de Kuramitsu⁽¹⁰²⁾, foi desenvolvido um ensaio multiplex qPCR para HTLV-1 e HTLV-2, que detectou cerca de 4 cópias de HTLV-1 por 10^5 células.

Um estudo de Rocha-Junior ⁽¹⁰³⁾, desenvolveu um método qualitativo duplex de PCR em tempo real, utilizando o gene *POL*. O limite de detecção para o HTLV-1 foi de 4 cópias e para o HTLV-2 foi de 10,9 cópias.

No teste diagnóstico descrito por Gonçalves ⁽⁸⁰⁾, no qual se baseia o presente estudo, o limite de detecção foi de 10 cópias para o HTLV-1, e para o HTLV-2 foi de 10 cópias para *TAX* e de 70 cópias para o gene *POL*. Esses valores são inferiores aos encontrados no presente estudo. Porém essa discrepância pode ser explicada pelo uso de um plasmídeo contendo cinco alvos distintos, uma vez que em ensaios de qPCR multiplex, a eficiência de amplificação pode ser influenciada pela presença simultânea de múltiplos pares de primers e sondas, o que pode causar uma competição por reagentes e afetar o desempenho do ensaio. E apesar do limite de detecção ser um pouco mais alto do que dos estudos descritos acima, o teste molecular será utilizado como um exame complementar para confirmação e discriminação do HTLV-1 e HTLV-2.

O slope da curva padrão está relacionado à inclinação da reta obtida por regressão linear entre os valores de Ct e o logaritmo do número de cópias do alvo, refletindo diretamente a eficiência da reação de PCR em tempo real ^{89, 138}. A eficiência de amplificação representa a capacidade da PCR em duplicar o alvo genético a cada ciclo ⁸⁹. O coeficiente de determinação (R^2) indica o grau de linearidade da curva padrão, expressando o quanto a variação dos valores de Ct pode ser explicada pela variação da concentração do alvo ^{89, 141}.

A eficiência considerada aceitável deve estar na faixa de 80% a 120%. O slope da curva de calibração, por sua vez, deve variar entre -3,1 e -3,6, sendo o valor ideal -3,32, o que corresponde a uma eficiência de 100%. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) deve ser igual ou superior a 0,98, indicando boa linearidade da curva. Porém, em cada ensaio, a possível inibição da PCR deve ser avaliada, uma vez que pode comprometer a eficiência da amplificação e levar a resultados incorretos ^{89, 104, 105}.

No presente estudo, as eficiências, slope e o R^2 para o alvo gene *POL* estiveram dentro do intervalo aceitável, indicando um bom desempenho da reação. Para o alvo *TAX* o valor da eficiência foi < 90%, porém ainda dentro da faixa aceitável, e os valores de slope e coeficiente de determinação (R^2) foram

dentro dos intervalos considerados aceitáveis, indicando que a reação desenvolvida é adequada e válida para aplicação no ensaio de qPCR para o HTLV-1/2.

Na análise dos ensaios de precisão, os valores de variância obtidos foram inferiores a 1, e os coeficientes de variação (CV%) estiveram na faixa de 3% a 10%, considerados aceitáveis conforme os critérios de outros estudos ^{80, 94, 99, 106, 107}.

A investigação do efeito da matriz biológica deve ser avaliada durante a validação de um método diagnóstico ¹⁰⁸, pois a presença de inibidores (hemoglobina, hematina, proteínas, ureia, anticoagulantes, resíduos da extração e medicamentos antivirais) ^{109, 110}, podem interferir na eficiência da reação. Nesse estudo, a avaliação do efeito matriz foi realizada por meio da comparação entre amostras diluídas em tampão TE e DNA de amostras negativas para HTLV, previamente testado por qPCR. Os valores de Ct, slope, eficiência e R^2 foram comparados para analisar a presença de inibidores. Observou-se uma alta semelhança entre os valores de Ct, slope, eficiência e R^2 nas condições testadas, todos dentro da faixa considerada aceitável. Além disso, média, desvio padrão, variância e coeficiente de variância também foram analisados, demonstrando resultados considerados aceitáveis ^{80, 94, 99, 106, 107}. Esses resultados sugerem que as amostras biológicas utilizadas neste estudo não apresentam constituintes que possam comprometer a eficiência da reação de amplificação, garantindo dados mais confiáveis na detecção molecular do HTLV ¹⁰⁹.

A população de pacientes incluída no presente estudo apresentou baixa prevalência de infecção pelo HTLV, em concordância com os dados nacionais. No Brasil, maior taxa de soroprevalência foi observada em Salvador com 1,78% ¹¹¹, porém os dados do 9º Boletim de Produção Hemoterápica revelam uma prevalência nacional de 0,15% para o HTLV ¹¹².

No Grupo 1, o HTLV foi detectado apenas nos pacientes previamente diagnosticados com a infecção (n=4). E os pacientes reagentes em baixos títulos ou inconclusivo para HTLV (n=9), todos foram não detectados para HTLV pelo teste molecular, resultados decorrente da alta sensibilidade do teste sorológico. Ji, Huimin ⁽¹¹³⁾ descreve que especialmente em populações de baixa prevalência, a alta taxa de falsos positivos por técnicas de

quimioluminescência é um problema relevante, recomendando-se que as amostras reagentes sejam confirmadas por outros ensaios. De maneira semelhante Carneiro- Proietti ⁽¹¹⁴⁾, ressalta que a triagem sanguínea sorológica em bancos de sangue para o HTLV apresenta elevada taxa de falsa reatividade, e que a utilização dos testes confirmatórios ainda é um desafio enfrentado pelos serviços de transfusão. Caterino-de-Araújo ⁽⁴⁸⁾ enfatiza que os testes de triagem (EIA e quimioluminescência) apresentam limitação na especificidade, recomendando a utilização dos ensaios moleculares como confirmatórios, utilizando os ensaios sorológicos apenas para amostras com PCR negativo e resultados discordantes, com o objetivo de reduzir o custo do diagnóstico do HTLV para o SUS.

No grupo 2, foi possível verificar uma especificidade de 100% (n=75) para o ensaio molecular desenvolvido. No entanto, cabe ressaltar que o teste sorológico aqui descrito não é considerado padrão-ouro, sendo estes o Western Blot (WB) e o Line Immunoassay (LIA). Porém, ambos apresentam limitações, como o elevado custo e a dificuldade na interpretação dos resultados, principalmente com os inconclusivos, o que dificulta a incorporação no SUS ⁴⁸. Assim, as comparações foram realizadas considerando que no HCFMB, apenas essa categoria de teste é disponibilizado. Contudo, a concordância total observada demonstra a boa aplicabilidade da qPCR. Em conformidade com os resultados encontrados por Andrade ⁽¹¹⁵⁾, a qPCR apresenta sensibilidade de 99,4% e especificidade de 98,5%. Dessa forma, por ser mais prática e com menor custo, a qPCR para HTLV pode substituir Western Blot (WB) como teste confirmatório em bancos de sangue.

No Grupo 3, composto por pacientes diagnosticados com HIV, a prevalência encontrada foi de 5,2% (n=3/57), e a concordância foi de 97,7% entre a qPCR_HTLV1/2 e o ensaio sorológico (ARCHITECT rHTLV-I/II), assim os resultados demonstram a aplicabilidade do ensaio molecular. A única discordância foi uma amostra (n=1) que foi detectada pelo ensaio de quimioluminescência e não pelo qPCR_HTLV1/2. Porém, essa amostra apresentou resultado em baixos títulos no teste sorológico, ainda, o paciente possui a infecção pelo HIV, condição que podem influenciar a detecção genoma proviral de HTLV-1/2 ^{116, 117, 118}. Uma vez que, os ensaios moleculares

podem apresentar menor sensibilidade em grupos infectados pelo HIV ^{69, 113, 119}.

No Grupo 4, composto por pacientes coinfectados com HIV e/ou hepatites virais, a prevalência de HTLV-2 foi de 7,5%(n=3/40), sendo um valor superior ao encontrado em doadores de sangue e em pacientes com HIV, sugerindo que pacientes coinfectados estão em grupo de maior risco para HTLV, frequentemente associada ao uso de drogas injetáveis e múltiplos parceiros ^{120, 121}. As três amostras detectadas foram associada a múltiplas infecções: HIV/HBV/HCV/HTLV-2 e HIV/HCV/HTLV-2. Estudos prévios indicam que pacientes com HTLV apresenta maior prevalência para o vírus da hepatite C ¹²², com predominância de coinfecção HTLV/HCV em homens com mais de 50 anos ^{123, 124}, características que estão em concordância com os pacientes incluídos neste estudo. A associação entre a sífilis e o HTLV ainda não apresenta evidências sobre os possíveis desfechos ^{125, 126}.

No Brasil, a coinfecção apresenta maior prevalência da coinfecção HTLV-2/HCV ¹²⁷, além disso, complicações hepáticas, como dano aos hepatócito, hepatocarcinogênese, altos níveis de alanina aminotransferase (ALT), são mais encontradas em casos de coinfecção HTLV-1/HCV do que com HTLV-2/HCV ^{127, 128, 129, 130, 131}.

A comparação com o ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories), ainda que não considerado como padrão-ouro, mostrou que o teste molecular diagnóstico aqui descrito teve uma alta especificidade. Porém a baixa disponibilidade de amostras positivas prejudicou a análise da sensibilidade do teste.

Além disso, o método *in house* apresentou um custo aproximado de R\$ 86,32 por teste, valor inferior aos kits comerciais disponíveis, considerando, o custo estimado na faixa de R\$ 100–200 por amostra, reforçando a viabilidade do teste para a implementação no HCFMB.

Os resultados das demais análises realizadas como limite de detecção, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) e influência da matriz biológica mostraram a eficácia do teste em detectar a presença de HTLV. Além disso, ressalta-se a necessidade de um método confirmatório, uma vez que o HCFMB ainda não dispõe de um teste para confirmar amostras reagentes ou inconclusivas provenientes do Hemocentro. Nos últimos anos, foram

registradas 15 amostras reagentes pelo Hemocentro, reforçando a importância dessa etapa adicional.

Atualmente, o Ministério da Saúde^{50, 51} ampliou o uso dos testes de triagem e teste confirmatório para o diagnóstico de HTLV em gestantes no pré-natal, puérpera e em criança com risco de transmissão vertical. Dessa forma, o estudo atingiu o objetivo de desenvolver um teste molecular confirmatório para detecção e diferenciação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2, possibilitando que o HCFMB disponibilize esse exame aos pacientes. Esse método está sendo incorporado ao rol de exames oferecidos pelo hospital.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi otimizado e validado um método “*in house*” utilizando a técnica de PCR em tempo real para detecção e identificação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2. Os resultados obtidos demonstram que o ensaio apresenta desempenho adequado para ser incorporado como método confirmatório no diagnóstico molecular do HCFMB, contribuindo para a exclusão de potenciais resultados falso-positivos da triagem sorológica e para a identificação precisa de amostras reagentes. A implementação desse teste no serviço permitirá maior segurança diagnóstica e favorecerá acompanhamento clínico dos pacientes.

7. REFERÊNCIAS

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(12):7415-9.
2. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(6):2031-5.
3. Gessain A, Barin F, Vernant J. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic Paraparesis. *Lancet*. 1985;2(8452):407-12.
4. Gonçalves D, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type I-associated diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):577-89.
5. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M. A new subtype of human T-cell leukemia virus HTLV-I associated with T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982;218(4572):571-3.
6. Mahieux R, Gessain A. New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4. *Med Trop (Mars)*. 2005;65(6):525-8.
7. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 2005;2:30.
8. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7994–9.
9. Martinez MP, Al-Saleem J, Green PL. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2019;16(1):21.
10. Maldonado JO, et al. Distinct morphology of human T-cell leukemia virus type 1-like particles. *Viruses*. 2016;8(5):132.
11. Seiki M, et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3618-22.
12. Carneiro-Proietti ABF. HTLV. Belo Horizonte: Fundação Hemominas; 2015. 651 p.
13. Zhao T. The role of HBZ in HTLV-1-induced oncogenesis. *Viruses*. 2016;8(2):34.
14. Bandeira LM, Puga MAM, Motta-Castro ARC. Infecção pelo HTLV: uma visão geral. [Internet]. 2021. [acesso em 17 nov 2025] Disponível em:

- https://repositorio.ufms.br/bitstream/123456789/3817/1/26%20-%20Larissa%20Melo_Infec%c3%a7%c3%a3o%20pelo%20HTLV%20uma%20vis%c3%a3o%20geral%20aprova%c3%a7%c3%a3o%2005-07.pdf.
15. Romanelli MG, Diani E, Bergamo E, Casoli C, Ciminale V, Bex F, et al. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. *Front Microbiol.* 2013;4:271.
 16. Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Rev Esp Quimioter.* 2019;32(6):485.
 17. Rosadas C, et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). *Epidemiol Serv Saúde.* 2021;30:e2020605.
 18. Satow Y, et al. Detecção de antígeno HTLV-I em linfócitos periféricos e do sangue do cordão umbilical de mães portadoras. *Lancet.* 1991;338(8772):915-6.
 19. Southern ŠO, Southern PJ. Persistent HTLV-I infection of breast luminal epithelial cells: a role in HTLV transmission? *Virology.* 1998;241(2):200-14.
 20. De Souza MM, et al. Transmissão vertical do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). *Rev Eletrônica Acervo Saúde.* 2023;23(7):e13043.
 21. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. *Diário Oficial da União, Brasília (DF), 22 out 2009; Seção 1:77.*
 22. Rosadas C, Miranda AE. Infecção pelo HTLV e suspensão do aleitamento materno: contexto e desafios na implementação das políticas de prevenção de forma universal no Brasil. *Epidemiol Serv Saúde.* 2023;32:e2023565.
 23. Nunes D, et al. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171303.
 24. Roucoux DF, et al. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)–I and HTLV-II. *J Infect Dis.* 2005;191(9):1490-7.
 25. Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet.* 1999;353(9168):1951-8.
 26. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria no 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria no 721/GM, de 09.08.89... *Diário Oficial da União, Brasília (DF), 2 dez 1993.*
 27. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(24):7588–90.

28. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993;196(1):25–33.
29. Longo DL, Gelmann EP, Cossman J, Young RA, Gallo RC, O'Brien SJ, et al. Isolation of HTLV-transformed B-lymphocyte clone from a patient with HTLV-associated adult T-cell leukaemia. *Nature*. 1984;310(5977):505–6.
30. Yoshikura H, Nishida J, Yoshida M, Kitamura Y, Takaku F, Ikeda S. Isolation of HTLV derived from Japanese adult T-cell leukemia patients in human diploid fibroblast strain IMR90 and the biological characters of the infected cells. *Int J Cancer*. 1984;33(6):745–9.
31. Melamed A, et al. Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog*. 2014;10 (3):e1004006.
32. Carpentier A, et al. Modes of human T cell leukemia virus type 1 transmission, replication and persistence. *Viruses*. 2015;7(7):3603-24.
33. Nejmeddine M, Bangham CR. The HTLV-1 virological synapse. *Viruses*. 2010;2(7):1427-47.
34. Van Prooyen N, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(48):20738-43.
35. Jones KS, Green PL. Cloaked virus slips between cells. *Nat Med*. 2010;16 (1):25-7.
36. Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Bénit L, Ruscetti FW, Hermine O, et al. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses*. 2011;3(6):794-810.
37. Carneiro-Proietti ABF, et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(5):499-508.
38. Viana GM, et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(1):50-3.
39. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388.
40. Ishida T, Hinuma Y. The origin of Japanese HTLV-I. *Nature*. 1986;322(6079):504.
41. Paiva A, Casseb J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57(1):1-14.
42. Ishak R, et al. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1995;11(7):813-21.
43. Kitagawa T, Tadokoro H, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I. Antibodies to HTLV-1 in Japanese immigrants in Brazil. *J Am Med Assoc*. 1986;256(17):2342.

44. Nakauchi CM, et al. Prevalence of human T cell leukemia virus-I (HTLV-I) antibody among populations living in the Amazon region of Brazil (preliminary report). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85(1):29-33.
45. Mota A, et al. A case-control study of HTLV-infection among blood donors in Salvador, Bahia, Brazil-associated risk factors and trend towards declining prevalence. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28(2):120-6.
46. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV. Brasília: Ministério da Saúde; 2021. 104 p.
47. Nascimento LB, et al. Prevalência da infecção pelo HTLV-1, em remanescentes de quilombos no Brasil Central. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):657-60.
48. Caterino-De-Araujo A, et al. Laboratory diagnosis of human T-lymphotropic virus in Brazil: assays, flowcharts, challenges, and perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54:e0175-2021.
49. Paiva A, et al. High risk of heterosexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in Brazil. *J Med Virol*. 2017;89(7):1287–94.
50. Brasil. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde amplia uso de teste para HTLV em gestantes no pré-natal. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 12 abr 2024 [acesso em 6 ago 2025]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/abril/ministerio-da-saude-amplia-uso-de-teste-para-htlv-em-gestantes-no-prenatal>.
51. Brasil. Ministério da Saúde. Infecções por HTLV em gestantes e crianças passam a ser notificadas de forma compulsória. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 20 fev 2024 [acesso em 6 ago 2025]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/fevereiro/infecoes-por-htlv-em-gestantes-e-criancas-passam-a-ser-notificadas-de-forma-compulsoria>.
52. Brites C, Sampalo J, Oliveira A. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS Rev*. 2009;11(1):8-16.
53. Beilke MA. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(2):139-47.
54. Pilotti E, et al. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2–infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood*. 2007;109(5):1850-6.
55. Barrios CS, et al. Inhibition of HIV type 1 replication by human T lymphotropic virus types 1 and 2 Tax proteins in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013;29(7):1061-7.

56. Castro E, Roger E. Hepatitis C virus/human T lymphotropic virus 1/2 co-infection: Regional burden and virological outcomes in people who inject drugs. *World J Virol.* 2016;5(2):68.
57. Alves FA, et al. Hepatitis C viral load in HCV-monoinfected and HCV/HIV-1-, HCV/HTLV-1/-2-, and HCV/HIV/HTLV-1/-2-co-infected patients from São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2018;22(2):123-8.
58. Moreira M, et al. Characteristics of co-infections by HCV and HBV among Brazilian patients infected by HIV-1 and/or HTLV-1. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(6):661-6.
59. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):270-80.
60. Martin F, Taylor GP, Jacobson S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(11):1531-46.
61. Ciminale V, et al. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. *Front Microbiol.* 2014;5:398.
62. Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses.* 2011;3(7):1074-90.
63. Souza A, et al. Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(5):545-52.
64. Yamauchi J, et al. An update on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) focusing on clinical and laboratory biomarkers. *Pharmacol Ther.* 2021;218:107669.
65. Tattermusch S, et al. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002480.
66. Malik B, Taylor GP. Can we reduce the incidence of adult T-cell leukaemia/lymphoma? Cost-effectiveness of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) antenatal screening in the United Kingdom. *Br J Haematol.* 2018;184(6):951-7.
67. Nakahata S, et al. Understanding the immunopathology of HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma: a comprehensive review. *Biomolecules.* 2023;13(10):1543.
68. Tan BJY, et al. HTLV-1 infection promotes excessive T cell activation and transformation into adult T cell leukemia/lymphoma. *J Clin Invest.* 2021;131(24):e150917.
69. Campos K, et al. Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Braz J Infect Dis.* 2017;21(3):297-305.

70. Da Silva Brito V, et al. Performance of Commercially Available Serological Screening Tests for Human T-Cell Lymphotropic Virus Infection in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2018;56(12):e00961-18.
71. Fujino R, et al. Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. *Jpn J Cancer Res*. 1991;82(4):367-70.
72. Zhao J, et al. HTLV screening of blood donors using chemiluminescence immunoassay in three major provincial blood centers of China. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):1-9.
73. Caterino-De-Araújo A, Gonçalves MG. Diagnóstico molecular do vírus T-linfotrópico humano (HTLV): histórico e estado da arte. *BEPA Boletim Epidemiol. Paulista*. 2021;18(215):14–62.
74. Abrams A, Akahata Y, Jacobson S. The prevalence and significance of HTLV-I/II seroindeterminate Western blot patterns. *Viruses*. 2011;3(8):1320-31.
75. WHO-World Health Organization. AIDS: Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/II. *Bull World Health Organ*. 1991;69(1):127-9.
76. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-De-Araujo A. Serological patterns for HTLV-I/II and its temporal trend in high-risk populations attended at Public Health Units of São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008;42(2):149-55.
77. Gastaldello R, et al. Efficiency of indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for the diagnosis of human retrovirus infection (HIV-1 and HTLV-I/II) in different at risk populations. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1999;41(3):159-64.
78. Romero-Ruiz S, Miranda-Ulloa E, Briceño-Espinoza R. Rendimiento diagnóstico de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra HTLV-1. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017;34(3):459-65.
79. Campos KR, et al. Line immunoassay for confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections in inconclusive western blot serum samples from Brazil. *J Clin Microbiol*. 2019;58(1):e01384-19.
80. Gonçalves MG, Fukasawa LO, Campos KR, Higa FT, Caterino-De-Araujo A. Development and validation of multiplex quantitative real-time PCR assays for simultaneous detection and differentiation of HTLV-1 and HTLV-2, using different PCR platforms and reagent brands. *Front Microbiol*. 2022;13:831594.
81. Ducasa N, et al. Low-cost and simple PCR process for access to molecular diagnosis of HTLV-1/2 in lowresource countries. *Acta Trop*. 2024;260:107395.
82. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(6):1292-305.

83. Figueiró-Filho EA, et al. Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(12):719-25.
84. Bangham CR. Human T cell leukemia virus type 1: persistence and pathogenesis. *Annu Rev Immunol*. 2018;36(1):43-71.
85. Matsuo M, et al. Identification and characterization of a novel enhancer in the HTLV-1 proviral genome. *Nat Commun*. 2022;13(1):2405.
86. 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. *J Infect Dis*. 2000;182(5):1343-9.
87. Eiraku N, et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol*. 1996;70(3):1481-92.
88. Steward GF, Culley AI. Extraction and purification of nucleic acids from viruses. *Man Aquat Viral Ecol*. 2010;16(1):154-65.
89. Bustin SA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
90. Higuchi R, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993;11(9):1026-30.
91. Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;20:152-68.
92. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(3):550-76.
93. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº 786, de 5 de maio de 2023. Publicada no Diário Oficial da União, Brasília (DF), 10 maio 2023.
94. Rosadas C, et al. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods*. 2013;193(2):536-41.
95. Caterino-De-Araujo 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 Sao Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998;30(3):173-82.
96. Matsumoto C, et al. Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method: comparison with HTLV-I antibody tests. *J Virol*. 1990;64(11):5290-4.
97. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem*. 2019;90:215-81.

98. Naderi M, et al. Design and development of a quantitative real time PCR assay for monitoring of HTLV-1 provirus in whole blood. *J Clin Virol.* 2012;53(4):302-7.
99. Estes MC, Sevall JS. PCR multiplex usando amplificação de DNA em tempo real para a detecção e quantificação rápidas de HTLV I ou II. *Mol Cell Probes.* 2003;17(2):59–68.
100. Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation, and quantification of human T-cell leukemia virus types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):1129-35.
101. Waters A, Oliveira ALA, Coughlan S, Venecia C, Schor D, Leite AC, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *J Clin Virol.* 2011;52(1):38–44.
102. Kuramitsu M, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for quantification and discrimination of human T-lymphotropic virus types 1 and 2. *J Med Virol.* 2019;91(6):1010–7.
103. Rocha-Junior MC, et al. Rapid and Sensitive Qualitative Duoplex Real-Time PCR Method for Discriminatory and Confirmatory Diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 Infections: Brazilian Multicentric Study. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:881630.
104. Johnson G, Nolan T, Bustin SA. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol Biol.* 2013;943:1–16.
105. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.* 2017;8:108.
106. Dehée A, et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods.* 2002;102(1-2):37-51.
107. Moens B, Lopez G, Adaui V, Gonzalez E, Kerremans L, Clark D, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3682–91.
108. Cassiano NM, et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Quim Nova.* 2009;32(4):1021-30.
109. Sun Y, et al. Development and validation of qPCR methods for nucleic acid biomarkers as a drug development tool: points to consider. *Bioanalysis.* 2023;15(17):1069-81.
110. Schrader C, et al. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012;113(5):1014-26.
111. Ribeiro AM, et al. Panorama do HTLV no Brasil: prevalência e diagnóstico ao Sistema Único de Saúde. *Observatorio de La Economía Latinoamericana.* 2024;22(3):e3667.

112. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 9º Boletim de Produção Hemoterápica. Brasília, DF: ANVISA; 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/producao-e-avaliacao-de-servicos-de-hemoterapia>.
113. Ji H, et al. A strategy for screening and confirmation of HTLV-1/2 infections in low-endemic areas. *Front Microbiol*. 2020;11:1151.
114. Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Hisada M, et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Pública*. 2006;19(1):44-53.
115. Andrade RG, et al. Análise do uso da PCR em tempo real para HTLV-1 e 2 como teste confirmatório na triagem de doadores de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2):111-5.
116. Machuca A, Soriano V. In vivo fluctuation of HTLV-I and HTLV-II proviral load in patients receiving antiretroviral drugs. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;24(2):189-93.
117. Costa EAS, Magri MC, Caterino-De-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2011;173(2):280-3.
118. Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, et al. Proviral features of human T cell leukemia virus type 1 in carriers with indeterminate Western blot analysis results. *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2838–49.
119. Montanheiro P, et al. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res*. 2008;135(1):22-5.
120. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005;21(3):926-31.
121. Moxoto I, et al. Sociodemographic, epidemiological and behavioral profile of women infected with HTLV-1 in Salvador, Bahia, an endemic area for HTLV. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(1):43-7.
122. Nakashima K, et al. Hepatitis C virus infection on Iki Island, Japan, an area endemic for human T-lymphotropic virus type-I. A preliminary study in patients at clinics or hospitals. *J Epidemiol*. 1994;4(1):17-23.
123. Moreno C, Balangero M, Barbás MG, Cudolá A, Gallego S. Diagnóstico serológico de HTLV-1/2: combinación de técnicas de tamizaje para definir el estatus serológico en donantes de sangre. *Rev Argent Microbiol*. 2013;45(3):165-8.
124. Caterino-De-Araujo A, et al. Making the invisible visible: searching for human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Brazilian patients with viral hepatitis B and C. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(2):130-4.

- 125.Carnaúba Jr D, Bittencourt A, Brites C. Atypical presentation of syphilis in an HTLV-I infected patient. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(4):273-7.
- 126.Rosadas C, Taylor GP. HTLV-1 and co-infections. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:812016.
- 127.Pereira FM, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus (HTLV) and hepatitis C co-infection in Bahia, Brazil. *PLoS One.* 2020;15(7):e0223087.
- 128.Hisada M, et al. Increased hepatitis C virus load among injection drug users infected with human immunodeficiency virus and human T lymphotropic virus type II. *J Infect Dis.* 2003;188(6):891-7.
- 129.Cardoso DF, et al. Influence of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection on laboratory parameters of patients with chronic hepatitis C virus. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2009;51(6):325-9.
- 130.Bahia F, et al. The impact of human T-cell lymphotropic virus I infection on clinical and immunologic outcomes in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011;57 Suppl 3:S202-7.
- 131.Silva MC, et al. HCV/HTLV coinfection: Does HTLV-1 interfere in the natural history of HCV-related diseases? *J Med Virol.* 2016;88(11):1967-72.
- 132.Bandeira LM, et al. Use of synthetic oligonucleotides for determination of HTLV-1 proviral load by real-time PCR: a helpful alternative approach in the clinical management. *J Appl Microbiol.* 2020;129(3):768-74.
- 133.Campos KR, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Costa NA, Barreto-Damião CH, Magri MC, et al. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2015;74(1):57-65.
- 134.Garcia IFDS, Hennington ÉA. HTLV: a stigmatizing infection? *Cad Saúde Pública.* 2019;35:e00005419.
- 135.Guerra AB, et al. Seroprevalence of HIV, HTLV, CMV, HBV and rubella virus infections in pregnant adolescents who received care in the city of Belém, Pará, Northern Brazil. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018;18(1):169.
- 136.Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, et al. Intra- and interlaboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: a multi-center study. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2361-7.
- 137.Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, 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. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2007;49(4):225-30.

138. Ruijter JM, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):e45.
139. Soltani A, et al. Molecular targeting for treatment of human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:770-8.
140. Takatsuki K. Adult T-cell leukemia. *Intern Med.* 1995;34(10):947-52.
- Thermo Fisher Scientific. Nucleic Acid Copy Number Calculator. [Internet]. [acesso em 5 maio 2025]. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-numbercalculator.html>.
141. Taylor, Sean C., et al. "The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time." *Trends in biotechnology* 37.7 (2019): 761-774.

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o Senhor (a) _____,
portador do RG nº _____, telefone: _____,
residente na _____

para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Implementação de um diagnóstico molecular confirmatório para a detecção do vírus HTLV no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu”, que será desenvolvido por mim: Isabela Cristina de Oliveira Souza, biomédica e aluna de mestrado pelo programa de Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), com orientação da Profª Drª Rejane Maria Tommasini Grotto, professora da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) e co-orientação da Profª Drª Rosana Antunes da Silveira.

Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

O objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento de um teste para melhorar o diagnóstico do vírus HTLV.

Se o(a) Sr.(a) aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: a coleta de amostra de 4 ml de seu sangue durante sua consulta ambulatorial, e caso seja doador de sangue, solicitarei 4 ml do seu sangue a ser coletado no mesmo momento da doação; autorização para consulta do prontuário clínico. As coletas acontecerão no Hospital das Clínicas da FMB, UNESP Campus de Botucatu Avenida Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, S/N - Jardim São Jose, Botucatu - SP, 18618-970. Informo que depois da coleta, o sangue será utilizado para a realização do exame, e o restante será armazenado no biorrepositório do Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB). Após o encerramento do projeto, as amostras serão descartadas de acordo com as normas do HCFMB.

Toda pesquisa com seres humanos envolve algum tipo de risco. No nosso estudo, os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são mínimos, relacionado somente à realização do procedimento de coleta de material e ao vazamento de informações. A coleta destas amostras pode gerar algum desconforto momentâneo, devido à utilização ao desconforto pela picada da agulha. Entretanto, potenciais riscos serão minimizados pela observância de técnicas preconizadas e ética profissional. Para isso, a coleta será realizada por pessoas da equipe do estudo com experiência nestes tipos de coleta. Todo detrimento à sua saúde decorrente de consequências da pesquisa serão arcadas pelos pesquisadores responsáveis. E suas informações serão acessadas somente por pessoas autorizadas e compromissadas com a ética profissional. Ademais, caso seja necessário os dados e documentos serão anonimizados antes de serem encaminhados pela equipe médica responsável pelos seus cuidados para qualquer outra instância, seja para o

patrocinador ou outros pesquisadores. Além disso, você tem o direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, conforme Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h.

Contudo, esta pesquisa também pode trazer benefícios. Os possíveis benefícios resultantes da participação na pesquisa são: contribuir para geração de conhecimento, que pode ajudar a melhorar nossa compreensão sobre o vírus HTLV, como diagnosticar a infecção de forma mais rápida e precisa, além de contribuir no tratamento de futuros pacientes. Se seu resultado for positivo, o seu resultado será informado via telefone e o(a) Sr.(a) será encaminhado para uma consulta no Ambulatório de Infectologia e receberá assistência integral.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso o(a) Sr.(a) decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento durante a pesquisa, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação sua participação na pesquisa e o(a) Sr.(a) não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá receber por despesas decorrentes de sua participação. Essas despesas serão pagas pelo orçamento da pesquisa, sendo elas: locomoção e alimentação, sendo do direito do participante pedir seu reembolso a qualquer momento durante o decorrer da pesquisa.

Caso ocorra algum problema ou dano com o(a) Sr.(a) resultante de sua participação na pesquisa, o(a) Sr.(a) receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal e você tem o direito de buscar indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Solicitamos também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica nacional e/ou internacional. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo absoluto, bem como em todas as fases da pesquisa.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como é garantido ao Sr.(a), o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que o(a) Sr.(a) queira saber antes, durante e depois da sua participação.

Caso o(a) Sr.(a) tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Isabela Cristina de Oliveira Souza, pelo telefone (14) 997416913, endereço Avenida Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, UNESP Campus de Botucatu, e/ou pelo e-mail **isabelaosouza@hotmail.com**, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) - UNESP localizado na Chacára Butignoli s/n, Rubião Júnior - Botucatu - São Paulo CEP: 18618-970 (Localizado na FAMESP) Fone: 3880-1608 / 3880-1609 E-mail: **cep.fmb@unesp.br**.

No caso específico de amostras já armazenadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA) excedentes dos exames da Rede Nacional de Carga Viral do HIV/HBV/HCV do Ministério da Saúde, será solicitado ao paciente via telefone cadastrado, o seu consentimento em um formulário fornecido via plataforma Google Forms.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma do(a) Sr.(a) e a outra para os pesquisadores.

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado: “Implementação de um diagnóstico molecular confirmatório para a detecção do vírus HTLV no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu “.

 Assinatura do participante	Data: ____/____/____
---	----------------------

Eu, Isabela Cristina de Oliveira Souza, declaro cumprir as exigências contidas nos itens IV.3 e IV.4, da Resolução nº 466/2012 MS.

 Assinatura do Pesquisador	Data: ____/____/____
--	----------------------

Testemunha (para casos de participantes analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual):

(Nome da testemunha como escrito no documento de identidade)

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante no estudo.

Nome do pesquisador: Isabela Cristina de Oliveira Souza:

Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo

Data ____/____/2025

ANEXO 2 – POP-Procedimento Operacional Padrão

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU



FACULDADE DE MEDICINA - UNESP

POP

Procedimento Operacional
Padrão

Laboratório de Biologia
Molecular

Rotinas Diagnósticas
(HTLV)

2025

LBA

L
A
B
O
R
A
T
Ó
R
I
O

D
E

B
I
O
T
E
C

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
CÓDIGO PADRÃO: LBA

REVISÃO Nº:
ELABORADO POR: Isabela Cristina de Oliveira Souza/Dra. Rosana Antunes da Silveira
DATA: 29/08/12024
VERIFICADO POR GERÊNCIA:
DATA: ____/____/ 2024
APROVADO EIQ:
DATA: ____/____/ 2024
PERIODICIDADE DA REVISÃO: 12 MESES
VALIDAÇÃO: DATA ____/____/ 2024
APROVADO DIRETORIA:
DATA: ____/____/ 2024
IMPLEMENTADO EM: ____/____/ 2018

DOCUMENTO CONTROLADO PELA GESTÃO DE QUALIDADE DO LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA – LBA – HC – FMB BOTUCATU. <u>A CÓPIA OU DISTRIBUIÇÃO SOMENTE SERÁ REALIZADA COM AUTORIZAÇÃO, POR ESCRITO, DA DIREÇÃO/GESTOR DA QUALIDADE.</u>	Nº DE CÓPIAS IMPRESSAS _____
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBAPág.: 79
		Emissão: 29/08/2024
		Revisão nº: Última Revisão:

**MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO
DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA**

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Laboratório de Biologia Molecular

Rotinas Diagnósticas

(HTLV)

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBAPág.: 80
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:

1ª Edição

2024

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190	POP LBA-Pág.: 81
		Emissão: 29/08/2024
		Revisão nº: Última Revisão:

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

Diretor: Dr^a Rejane Maria TommasiniGrotto
Diretor Substituto: Dr. Matheus Bertanha

Gestão da Qualidade: Dr^a Rita de Cássia Alvarado

Grupo Gestor:

Responsável: Dr^a. Rejane Maria TommasiniGrotto

Responsáveis Técnicos: Isabela Cristina de Oliveira Souza

Autoria: Msc. Gabriela Boni Poli
Isabela Cristina de Oliveira Souza
Dr. Leonardo Nazário de Moraes
Msc. Maércio José de Oliveira Alho
Dra. Rosana Antunes da Silveira

Elaboração: Isabela Cristina de Oliveira Souza
Dr. Leonardo Nazário de Moraes
Dra. Rosana Antunes da Silveira

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210</u>	POP LBA Pág.: 82
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA		Revisão nº:
		Última Revisão:
ÍNDICE		

Procedimento

1. Limpeza e descontaminação	83
2. Coleta, manuseio e transporte de amostras	85
3. Recebimento e identificação de amostras	87
4. Preparo, separação e armazenamento de amostras	89
5. Registro de entrada de amostras	91
6. Extração de DNA por coluna de sílica	92
7. Quantificação e diluição de amostras de DNA	94
8. Preparo da reação de PCR em tempo real	96
9. Análise dos resultados	101
10. Liberação dos resultados	103
11. Documentos de referência	104

Anexos

Anexo 01 - Reagentes para lise de hemácias	105
Anexo 02 - Reagentes de extração de DNA	105
Anexo 03 - Preparação da mistura de primers e sondas para detecção de HTLV e controle endógeno (gene albumina)	106
Anexo 04 - Sequências de primers e sondas para detecção de HTLV	108
Anexo 05 - Planilha de controle de limpeza	109
Anexo 06 - Planilha de controle de temperatura	110

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210</u>	POP LBA Pág.: 83
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
1. LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO		

SIGLAS:

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

OBJETIVOS:

Evitar a contaminação e perda dos exames

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

USO DE EPIS:

- ✓ Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho.
- ✓ Touca
- ✓ Máscara
- ✓ Luvas sem talco
- ✓ Óculos de proteção
- ✓ Sapatos fechados

MATERIAIS:

- ✓ Hipoclorito 1%
- ✓ Álcool 70%
- ✓ Gaze
- ✓ Extran
- ✓ Água Milli-Q

PROCEDIMENTO:

LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO

Procedimentos diários:

- ✓ As bancadas deverão ser limpas com solução de hipoclorito a 1%, água destilada e solução de etanol 70% a cada início e fim de procedimento, pelo próprio usuário.
- ✓ As centrífugas deverão ser limpas com solução de álcool 70% após cada utilização, procedimento este de responsabilidade do usuário.
- ✓ As maçanetas deverão ser limpas com solução de Álcool 70%, procedimento este de responsabilidade do setor de limpeza da FMB.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210</u>	POP LBA Pág.: 84
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
1. LIMPEZA E DESCONTAMINAÇÃO		

Procedimentos semanais

- ✓ O chão deverá ser limpo com solução de cloro ou fenol quaternário diluído segundo fabricante, procedimento este de responsabilidade do setor de limpeza da FMB.
- ✓ Os panos para as áreas pré e pós deverão ser separados.
- ✓ Tirar o pó das prateleiras com pano tipo *perfex* umedecido com água, organizar as gavetas, limpar as quatro paredes do fluxo utilizando álcool 70% ou álcool iodado.

Procedimentos mensais

- ✓ Descongelar freezers, limpar todos os armários.

RISCOS:

Contaminação das amostras ocasionando resultados falso-positivos, os quais podem ocasionar a uma conduta terapêutica inadequada.

REFERÊNCIAS NORMATIVAS

Legislação Vigente.

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Registros de rotina e monitoramento de processos (próprios dos equipamentos).

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA Pág.: 85
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
2. COLETA, MANUSEIO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS		

SIGLAS

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

IST - Infecção Sexualmente Transmissível

HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas

LBA - Laboratório de Biotecnologia Aplicada

HCFMB - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

OBJETIVOS:

Coletar amostra de sangue venoso para detecção molecular de HTLV.

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

MATERIAIS:

- ✓ Seringa
- ✓ Agulha
- ✓ Tubos de coleta de sangue com EDTA
- ✓ Etiquetas de identificação
- ✓ Grade de transporte
- ✓ Embalagem de isopor/ térmica
- ✓ Gelo reciclável

PACIENTES PARA A COLETA:

- ✓ Casos novos e pacientes em acompanhamento ambulatorial com detecção positiva para HTLV por sorologia.

PROCEDIMENTO:

COLETA:

- ✓ Aparamentar-se com EPIs adequados;
- ✓ Identificar os tubos com o nome completo do paciente e data de nascimento;
- ✓ Realizar assepsia com algodão embebido em álcool 70% e realizar a coleta preferencialmente a vácuo, se não for possível, e a coleta for realizada com seringa e agulha, não abrir os tubos (não realizar punção arterial);

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA Pág.: 86
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
2. COLETA, MANUSEIO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS		

- ✓ Realizar a coleta de 1 tubo de EDTA (tampa roxa) de 4 mL;
- ✓ Homogeneizar os tubos por inversão, delicadamente, de 3 a 5 vezes;
- ✓ Encaminhar as amostras ao LBA/HCFMB.

ARMAZENAMENTO

Manter em temperatura ambiente ou refrigerada (2° a 8°C) (não congelar).

TRANSPORTE

O sangue deverá ser transportado em grade, em embalagem de isopor contendo a base de gelo reciclável e acondicionado em caixa dura, com fecho de segurança, acompanhado da requisição.

USO DE EPIS:

- ✓ Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho.
- ✓ Touca
- ✓ Máscara
- ✓ Luvas de procedimentos
- ✓ Óculos de proteção
- ✓ Sapatos fechados

RISCOS:

Coagulação do sangue por falta de homogeneização da amostra. Perda da amostra por acondicionamento ou transporte de forma inadequada. Identificação incorreta de tubos.

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.104p.

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA Pág.: 87
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
3. RECEBIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS		

SIGLAS:

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas

OBJETIVOS:

Receber e identificar as amostras coletadas para realização dos exames

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

MATERIAIS:

- ✓ Tubo de sangue com anticoagulante EDTA

PROCEDIMENTO:

RECEBIMENTO DE AMOSTRAS

- ✓ Utilizar os equipamentos de proteção individual e coletiva.
- ✓ Na chegada das caixas térmicas contendo as amostras ao laboratório, verificar condições de transporte.
- ✓ Conferir os dados das requisições com os dados descritos nos tubos etiquetados.
- ✓ Iniciar o processamento da amostra.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Este procedimento deve ser realizado na sala pré-PCR na área de recebimento das amostras.

- ✓ Os tubos e as requisições deverão ser etiquetados com o número sequencial interno.
- ✓ Todo o processo de identificação é realizado em dupla checagem para que não ocorram erros de identificação das amostras.

USO DE EPIS:

- ✓ Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o Joelho.
- ✓ Touca
- ✓ Máscara
- ✓ Luvas de procedimentos
- ✓ Óculos de proteção
- ✓ Sapatos fechados

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA Pág.: 88
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
3. RECEBIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS		

RISCOS:

Atribuição incorreta da numeração interna do laboratório nos tubos e requisições, podendo resultar em perda do exame.

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.104p.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 89
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:
4. PREPARO, SEPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS		

SIGLAS

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

g - Força G

µL- Microlitros

mL - Mililitros

OBJETIVOS:

Promover a lise das hemácias e lavagem do *pellet* de leucócitos para armazenamento e posterior acondicionamento em ultrafreezer - 80°C.

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

MATERIAIS:

- ✓ Tubo do tipo *ependorf* de 1,5mL
- ✓ Tampão de lise de hemácias (Anexo 1)
- ✓ Tubo Falcon de 15 mL
- ✓ Estante para Falcon de 15 mL
- ✓ Pipetas *Pasteur* de plástico
- ✓ Ponteiras com barreira (filtro)
- ✓ Centrifuga com caçapas para tubos de 4 mL
- ✓ Recipiente para descartar líquidos potencialmente infectantes
- ✓ Pipetas de 20 µL e 1000 µL
- ✓ Caixas de soroteca
- ✓ Ultrafreezer - 80°C

PROCEDIMENTO:

Este procedimento deve ser realizado em sala pré-PCR na área de manipulação de amostras.

- ✓ Verificar se foi colhido 1 tubo de aproximadamente 4 mL de amostra em tubo a vácuo de tampa roxa com EDTA.
- ✓ Centrifugar o tubo a 1500 x g por 10 minutos.
- ✓ Recuperar o *buffycoat* (aproximadamente 500 µL - 1000 µL) da interface entre o plasma e as hemácias e transferir para tubo Falcon de 15 mL.

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 90
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
4. PREPARO, SEPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS		

- ✓ Completar para 14 mL com tampão de lise de hemácias, homogeneizar e incubar sob agitação (gangorra) por 10 minutos.
- ✓ Centrifugar por 5 minutos a 4 °C por 1500 x g e descartar o sobrenadante.
- ✓ Lavar a superfície do *buffycoat* com tampão de lise para remover hemácias sem perturbar o *pellet*.
- ✓ Repetir o passo anterior se necessário.
- ✓ Ressuspender o *buffycoat* de leucócitos em 250 µL de tampão de lise e transferir 250 µL do volume para um tubo de 1,5 mL (proceder a transferência usando pipeta *Pasteur*).

Armazenamento em freezer

- ✓ Após a separação das amostras, acondicionar os tubos contendo *buffy coat* em caixas de soroteca.
- ✓ Identificar a caixa com informações do exame a ser realizado (HTLV), ano e numeração sequencial.
- ✓ Armazená-la em ultrafreezer -80°C.
- ✓ Caso seja necessário, algumas alíquotas podem ser armazenadas em freezer -20°C.
- ✓ Registrar o armazenamento no mapa de localização de amostras do ultrafreezer -80°C.

USO DE EPIS:

- ✓ Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho.
- ✓ Touca
- ✓ Máscara
- ✓ Luvas de procedimentos
- ✓ Óculos de proteção
- ✓ Sapatos fechados

RISCOS:

Contaminação cruzada. Armazenamento em temperatura incorreta.

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 1989.

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 91
		Emissão: 21/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
	5. REGISTRO DE ENTRADA DE AMOSTRAS	

SIGLAS

HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas

OBJETIVOS

Cadastrar as amostras recebidas em uma planilha

RESPONSABILIDADES

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

PROCEDIMENTO:

Registro das amostras

✓ Após a identificação e separação das amostras, registrar as informações: nome do paciente, data da coleta e numeração sequencial de coleta das amostras de HTLV na planilha destinada a este fim.

RISCOS:

Cadastro incorreto das informações na planilha, prejudicando a localização das amostras e a liberação do laudo.

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190	POP LBA Pág.: 92
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
6. EXTRAÇÃO DE DNA POR COLUNA DE SÍLICA		

SIGLAS

μL - Microlitros

g - Força G

DNA - Ácido desoxirribonucleico

PBS - Tampão Fosfato-Salino (*Phosphate Buffered Saline*)

OBJETIVOS:

Isolar DNA genômico.

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

MATERIAIS:

- ✓ Coluna de sílica
- ✓ Tampão de lise (Anexo 2)
- ✓ Cobas® Omni Wash Reagent (Roche Molecular Systems)
- ✓ Proteinase K
- ✓ Solução de PBS
- ✓ Etanol absoluto
- ✓ Tampão de eluição
- ✓ Micropipeta ajustável de 200 μL e ponteiros com barreira
- ✓ Micropipeta ajustável de 1000 μL e ponteiros com barreira
- ✓ Estante para tubos do tipo *ependorf*
- ✓ Termobloco
- ✓ Microcentrifuga
- ✓ Tubos do tipo *ependorf* de 1,5 mL
- ✓ Tubos coletores de 2 mL

PROCEDIMENTO:

- ✓ Centrifugar o tubo contendo *buffycoat* mais tampão de lise de hemácias a 6000 x g por 1 minuto.
- ✓ Retirar o sobrenadante e adicionar 140 μL de PBS ao *buffycoat* no fundo do tubo.
- ✓ Pipetar 5 μL de proteinase K no tubo com *buffycoat* e PBS.

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA Pág.: 93
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:	
	Última Revisão:	
6. EXTRAÇÃO DE DNA POR COLUNA DE SÍLICA		

- ✓ Vortexar por pulso de 15 segundos, centrifugar rapidamente os tubos (spin) para remover as gotas da tampa.
- ✓ Adicionar 560 µL do tampão de lise de extração e vortexar por pulso de 15 segundos.
- ✓ Incubar a 56°C por 10 minutos.
- ✓ Centrifugar rapidamente os tubos, para remover as gotas da tampa.
- ✓ Adicionar 560 µL de etanol absoluto e homogeneizar vortexando por pulso de 15 segundos.
- ✓ Centrifugar rapidamente os tubos.
- ✓ Transferir 630 µL da mistura para uma coluna de sílica contida em um tubo coletor de 2 mL.
- ✓ Centrifugar a 16000 x g por 1 minuto.
- ✓ Recolocar a coluna em um tubo limpo de 2 mL e descartar o tubo contendo o filtrado.
- ✓ Transferir 630 µL da mistura para uma coluna de sílica contida em um tubo coletor de 2 mL.
- ✓ Centrifugar a 16000 x g por 1 minuto.
- ✓ Recolocar a coluna em um tubo limpo de 2 mL e descartar o tubo contendo o filtrado.
- ✓ Adicionar 500 µL do Cobas® Omni Wash Reagent.
- ✓ Centrifugar a 6000 x g por 1 minuto.
- ✓ Recolocar a coluna em um tubo limpo de 2 mL e descartar o tubo contendo o filtrado.
- ✓ Adicionar 500 µL do Cobas® Omni Wash Reagent.
- ✓ Centrifugar a 16000 x g por 3 minutos (ao preparar DNA a partir de *buffycoat* ou linfócitos, recomenda-se a centrifugação em velocidade máxima para evitar entupimento).
- ✓ Recolocar a coluna em um tubo limpo de 2 mL e descartar o tubo contendo o filtrado.
- ✓ Centrifugar a 16000 x g por 1 minuto.
- ✓ Deixar o tubo aberto para secar o etanol por 3 minutos.
- ✓ Recolocar a coluna em um tubo do tipo *ependorf* de 1,5 mL previamente identificado e descartar o tubo contendo o filtrado.
- ✓ Adicionar 60 µL do tampão de eluição ou água destilada no centro da coluna.
- ✓ Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos.
- ✓ Centrifugar a 6000 x g por 1 minuto.
- ✓ Descartar a coluna.
- ✓ Armazenar o DNA eluído em freezer a -20°C.

RISCOS:

Contaminação cruzada, identificação incorreta das amostras e perda do material.

Elaboração: NO máximo 3 autores	Aprovação: Diretoria do Lab. Biotecnologia Aplicada – LBA/HCFMB
Aprovação SESMT	Assessorias: Gestão da Qualidade – LBA e Núcleo de Gestão da Qualidade do HCFMB

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 94
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA		Revisão nº:
		Última Revisão:
7. QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DE AMOSTRAS DE DNA		

SIGLAS

μL – Microlitros

OBJETIVOS:

Quantificar e diluir as amostras de DNA

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

EQUIPAMENTO:

- ✓ Nanodrop;
- ✓ Micropipetas de 10 μL;
- ✓ Ponteiras com barreira de 10 μL;
- ✓ Lenço macio

MATERIAIS:

- ✓ Micropipetas de 10 μL
- ✓ Ponteiras com barreira de 10 μL
- ✓ Lenço macio
- ✓ Água Mili-Q

PROCEDIMENTO

- ✓ Realizar a calibragem com o “branco” utilizando a mesma solução tampão da etapa de eluição.
- ✓ Para evitar danos ao equipamento, é necessário posicionar apropriadamente o pedestal superior antes de iniciar a leitura.
- ✓ Clicar em *Measure*.
- ✓ Pipetar 2 μL no DNA eluído no pedestal e iniciar a leitura.
- ✓ Clicar em *Measure*.
- ✓ Efetuar a limpeza dos pedestais com lenço macio entre as leituras.
- ✓ Efetuar a limpeza com Água Mili-Q e lenço macio após o término das leituras.
- ✓ A concentração dos padrões de quantificação é expressa em ng/μL.
- ✓ A concentração é calculada conforme a seguinte tabela:

Resultado quantificação	Concentração
-------------------------	--------------

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 95
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
	7. QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DE AMOSTRAS DE DNA	

< 100 ng/μL	Pipetar 9,5 μL de DNA na reação
> 100 ng/μL	Diluir para a concentração de 100 ng/μL

- ✓ Após a quantificação, as amostras devem ser diluídas conforme a seguinte fórmula:

Fórmula da diluição: $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$

C1= Concentração quantificada

V1= Volume [μL] de DNA a ser aliqotado

C2= 100ng/μL (concentração para uso na qPCR)

V2= 50 μL (Volume final da solução de uso)

- ✓ Após a diluição, as amostras originais e as diluídas devem ser armazenadas em freezer - 20°C.

RISCOS:

Imprecisão na quantificação acarretando diluição incorreta das amostras de DNA.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 96
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:	
	Última Revisão:	
8. PREPARO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL		

SIGLAS

µL - Microlitros

qPCR- Reação em cadeia da polimerase em tempo real

OBJETIVOS:

Preparo da reação para qPCR para detecção do vírus HTLV

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

USO DE EPIS:

- ✓ Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho;
- ✓ Touca;
- ✓ Máscara tripla;
- ✓ Luvas de procedimentos sem talco;
- ✓ Sapatos fechados.

RISCOS:

- ✓ Diluição incorreta dos reagentes
- ✓ Preparo incorreto das reações

MATERIAIS

- ✓ Centrífuga;
- ✓ Centrífuga;
- ✓ Micropipetas de 10 µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL
- ✓ Ponteiras com barreira de 10 µL, 100 µL, 200 µL e 1000 µL
- ✓ Rack de tubos de 2 mL;
- ✓ Tiras para qPCR ou placa de qPCR de 96 poços;
- ✓ Tampa para tiras ou selo de placa para qPCR;
- ✓ Agitador Vortex;
- ✓ Gazes para limpeza;
- ✓ Pisseta com álcool 70%;
- ✓ Hipoclorito de sódio 1%;
- ✓ Microtubos tipo *ependorf* de 2 mL;
- ✓ GoTaq® Probe qPCR Master Mix sem Rox [item do kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega)].
- ✓ Soluções estoque de primers e sondas para o gene *POL*, *TAX* e *ALBUMINA* (controle endógeno).

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 97
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:
	8. PREPARO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL	

Todos os procedimentos descritos a seguir devem ser realizados na área pré-amplificação.

PRÉ-PREPARO DA MISTURA DE PRIMERS E SONDAS PARA DETECÇÃO DE HTLV E DO CONTROLE ENDÓGENO (ALBUMINA)

- ✓ Ligar a ventilação da cabine de segurança biológica, abrir a porta de vidro, passar álcool 70% com auxílio de gases sobre a superfície interna, fechar a porta e ligar a luz UV por 15 minutos. Desligar a luz UV e ligar a luz branca.
- ✓ Descongelar as soluções estoque de primers e sondas estoques a 100 µM.
- ✓ Agitar cuidadosamente os microtubos em vortex e centrifugar brevemente.
- ✓ Transferir os microtubos para a cabine de segurança biológica e adicionar o volume descrito de cada oligo de acordo com o Anexo 3, de forma a preparar um ensaio para o gene *POL* e outro para o gene *TAX*.
- ✓ Os ensaios são preparados para 100 reações.

PREPARO DA REAÇÃO DE qPCR PARA DETECÇÃO DE HTLV

- ✓ Ligar a ventilação da cabine de segurança biológica, abrir e passar álcool 70% com auxílio de gases sobre a superfície interna, fechar a porta e ligar a luz UV por 15 minutos. Desligar a luz UV e ligar a luz branca.
- ✓ Retirar os reagentes do freezer e descongelar.
- ✓ Na cabine de segurança biológica, preparar um mix de reação de qPCR para o gene *POL* segundo a Tabela 1 e um segundo mix para o gene *TAX* segundo a Tabela 2.

Tabela 1 - Preparo do mix da reação de qPCR para o gene *POL*

Reagente	Volume p/ 1 amostra (µL)
Água ultrapura q.s.p	0
GoTaq [®] ProbeqPCR Master Mix sem Rox	10
Mistura de primers e sondas HTLV (<i>POL</i>) + Albumina*	0,5

* Sequências de primers e sondas para detecção de HTLV e do controle endógeno são as descritas em Gonçalves et al. (2022) e estão no Anexo 3.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190	POP LBA- Pág.: 98
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:	
	Última Revisão:	
8. PREPARO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL		

Tabela 2 - Preparo do mix da reação de qPCR para o gene *TAX*

Reagente	Volume p/ 1 amostra (µL)
Água ultrapura q.s.p	0
GoTaq [®] ProbeqPCR Master Mix sem Rox	10
Mistura de primers e sondas HTLV (TAX) + Albumina*	0,5

* Sequências de primers e sondas para detecção de HTLV e do controle endógeno são as descritas em Gonçalves *et al.* (2022) e estão no Anexo 3.

- ✓ Distribuir 10,5 μ L de cada respectivo mix de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 - Modelo de placa de qPCR para detecção de HTLV

[illegible]

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 99
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº: Última Revisão:
8. PREPARO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL		

FORA DA CABINE DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

- ✓ Acrescentar 9,5 µL de DNA (100 ng/ µL) de cada amostra nos poços correspondentes.
- ✓ Acrescentar 9,5 µL de H₂O nos poços correspondentes ao controle negativo.
- ✓ Acrescentar 5 µL do controle positivo e 4,5 µL de H₂O nos poços correspondentes ao controle positivo. Obs.: o controle positivo é preparado misturando-se amostras positivas para HTLV-1 e 2 no mesmo tubo.
- ✓ Selar a placa.
- ✓ Na área pós-PCR colocar a placa nos equipamentos de PCR em tempo real CFX96 ou CFX Opus (BioRad®).
- ✓ Abrir o programa Bio-Rad CFX Maestro.
- ✓ Clicar em *User-defined*.
- ✓ Na aba *Protocol*, selecionar a opção *HTLV_ciclo*.
- ✓ Na aba *Plate*, selecionar a opção *HTLV_plate* e entrar com o número de registro interno da amostra nos poços correspondentes.
- ✓ Conferir os parâmetros de termociclagem e utilizar as seguintes condições de termociclagem (Tabela 3):

Tabela 3 - Condições de termociclagem para detecção de HTLV por qPCR

Passo	n°. ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação	1	95° C	3 minutos
Anelamento, extensão e captura de fluorescência	50	95° C	15 segundos
		60° C	1 minuto

- ✓ Na aba *Run*, clicar em *Start*, salvar e iniciar a corrida.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA- Pág.: 100
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA		Revisão nº:
		Última Revisão:
8. PREPARO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL		

DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

Gonçalves, M. G., Fukasawa, L. O., Campos, K. R., Higa, F. T., & Caterino-de-Araujo, A. (2022). Development and validation of multiplex quantitative real-time PCR assays for simultaneous detection and differentiation of HTLV-1 and HTLV-2, using different PCR platforms and reagent brands. *Frontiers in Microbiology*, 13, 831594.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA-Pág.: 101
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:
	9. ANÁLISE DOS RESULTADOS	

SIGLAS

CT - *Cycle threshold*

OBJETIVOS

Análise dos resultados da detecção de HTLV por qPCR

RESPONSABILIDADE:

Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos

PROCEDIMENTO:

- ✓ Para a detecção de HTLV-1 as sondas para os genes *POL* e *TAX* foram desenhadas com o corante repórter FAM. Para HTLV-2 com Cy5 como descrito abaixo:

FAM	Pol_HTLV1
FAM	Tax_HTLV1
Cy5	Pol_HTLV2
Cy5	Tax_HTLV2
HEX	Albumina

- ✓ Após finalizada a corrida, ajustar os valores de *threshold* de acordo com os valores abaixo:

Alvo	Valor <i>Threshold</i>
FAM	150
HEX	250
Cy5	150

- ✓ Avaliar os resultados de qPCR de acordo com os seguintes critérios:

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA-Pág.: 102
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:
	9. ANÁLISE DOS RESULTADOS	

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Considerar detectada a amostra que apresentar amplificação para ambos os alvos (FAM e Cy5).

Considerar inconclusiva a amostra que apresentar amplificação para apenas um dos alvos, devendo ser solicitada nova coleta.

	<i>POL</i>	<i>TAX</i>	Resultado
HEX - Albumina (controle endógeno)	20 <Ct< 40	20 <Ct< 40	Válido
	Ct> 40 ou INDETERMINADO	Ct> 40 ou INDETERMINADO	Inválido
FAM	20 <Ct< 40	20 <Ct< 40	HTLV-1 Detectado
	N/A	N/A	Não detectado
Cy5	20 <Ct< 40	20 <Ct< 40	HTLV-2 Detectado
	N/A	N/A	Não detectado

RISCOS: Interpretação incorreta de resultados, resultando na liberação de falso-negativos ou falso-positivos.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA-Pág.: 103
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:
10. LIBERAÇÃO DOS RESULTADOS		

SIGLAS

HCFMB - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

HTLV - Vírus linfotrófico de células T humanas

LBA - Laboratório de Biotecnologia Aplicada

OBJETIVOS

Liberação dos resultados das amostras executadas.

RESPONSABILIDADES

Biólogos ou Biomédicos.

PROCEDIMENTO:

Liberação dos resultados

- ✓ Os resultados obtidos são enviados ao setor de emissão de laudos do LBA.
- ✓ Os laudos de HTLV são liberados no sistema *Soul MV*, ferramenta utilizada pelo HCFMB para gestão do fluxo de dados de pacientes entre setores do hospital.

RISCOS:

Liberação incorreta dos resultados e consequente conduta inadequada ao paciente.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA-Pág.: 104
		Emissão: 29/08/2024
MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA		Revisão nº:
		Última Revisão:
11. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA		

1- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.104p.

2- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. 1989.

3- Gonçalves, M. G., Fukasawa, L. O., Campos, K. R., Higa, F. T., &Caterino-de-Araujo, A. (2022). Development and validation of multiplex quantitative real-time PCR assays for simultaneous detection and differentiation of HTLV-1 and HTLV-2, using different PCR platforms and reagent brands.Frontiers in Microbiology, 13, 831594.

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA <u>Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n- Unesp - Campus de Botucatu</u> <u>CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6041 RAMAL 206/2190</u>	POP LBA-Pág.: 105
		Emissão: 29/08/2024
	MANUAL DE PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO LABOARTÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - LBA	Revisão nº:
		Última Revisão:
11. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA		

Anexo 1: Reagentes para lise de hemácias

Tampão de lise de hemácias

Reagentes	Final	Para 1 L
Bicarbonato de Amônio (PM: 79.06 g/mol)	10 mM	0,79 g
Cloreto de Amônio (PM: 53.49g/mol)	144 mM	7,7 g
H2O ultrapura	-	Para 1 L

Pesar os sais e adicionar água ultrapura em um béquer até o volume próximo a 1 L. Transferir a solução para um balão volumétrico e acertar o volume para 1 L. Homogeneizar até a completa dissolução. Armazenar em um frasco de vidro e manter na geladeira de 2 a 8 °C (validade de 1 mês).

Anexo 2: Reagentes de extração

Tampão de lise (TL) (mesmo que o Buffer AL do Kit da Qiagen):

Reagentes [Final]	[Estoque]	p/100mL
Cloridrato de guanidina - MW: 95.53 40% (%w/w)	Puro	40 g
Tris HCl [50mM]	1 M	5 mL
EDTA [10mM]	0.5 M	2 mL
Acetato de sódio [0.37M]	3 M	12,3 mL
Triton X- 100	2%	2 mL
H2O q.s.p	-	100 mL

Anexo 3: Preparação da mistura de *primers* e sondas para detecção de HTLV e controle endógeno (gene albumina).

Preparo dos *primers* e sondas na forma de ensaio para o gene *POL*:

		Volume da PCR	20	N. de testes
		Volume do ensaio		200
Para Pol - HTLV	[Estoque uM]	[final na PCR (uM)]	Volume p/ reação	
Primer HTLV-1-F	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-F	100	0,6	0,12	24
Primer HTLV-2-R	100	0,5	0,1	20
Primer HTLV-1-P	100	0,15	0,03	6
Primer HTLV-2-P	100	0,15	0,03	6
Primer Album-F	100	0,05	0,01	2
Primer Album-R	100	0,1	0,02	4
Primer Album-P	100	0,15	0,03	6
			Total	100
			água qsp	0
			Total	100

Usar 5 microlitos do ensaio em cada reação de PCR a fim de obter a concentração final

Preparo do ensaio (*primers* e *probes*)

		Volume da PCR	20	N. de testes
		Volume do ensaio	5	200
Para TAX - HTLV	[Estoque uM]	[final na PCR (uM)]	Volume p/ reação	
Primer HTLV-1-F	100	0,2	0,04	8
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-F	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-1-P	100	0,15	0,03	6
Primer HTLV-2-P	100	0,15	0,03	6
Primer Album-F	100	0,05	0,01	2
Primer Album-R	100	0,1	0,02	4
Primer Album-P	100	0,15	0,03	6
			Total	80
			água qsp	20
			Total	100

Usar 0,5 microlitos do ensaio em cada reação de PCR a fim de obter a concentração final.

Preparo dos primers e sondas na forma de ensaio para o gene POL:

				N°. de testes
				100
Para Pol - HTLV	Concentração da Solução Estoque [μM]	Concentração na solução final de PCR (μM)	Volume da solução estoque	
Primer HTLV-1-F	100	0,4	0,08	8
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	8
Primer HTLV-2-F	100	0,6	0,12	12
Primer HTLV-2-R	100	0,5	0,1	10
Sonda HTLV-1-P	100	0,15	0,03	3
Sonda HTLV-2-P	100	0,15	0,03	3
Primer Album-F	100	0,05	0,01	1
Primer Album-R	100	0,1	0,02	2
Sonda Album-P	100	0,15	0,03	3
			Total	50

Usar 0,5 microlitos do ensaio em cada reação de PCR a fim de obter a concentração final.

Preparo dos primers e sondas na forma de ensaio para o gene TAX:

				N. de testes
				100
Para TAX - HTLV	Concentração da Solução Estoque [μM]	Concentração na solução final de PCR (μM)	Volume da solução estoque	
Primer HTLV-1-F	100	0,2	0,04	4
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	8
Primer HTLV-2-F	100	0,4	0,08	8
Primer HTLV-2-R	100	0,4	0,08	8
Sonda HTLV-1-P	100	0,15	0,03	3
Sonda HTLV-2-P	100	0,15	0,03	3
Primer Album-F	100	0,05	0,01	1
Primer Album-R	100	0,1	0,02	2
Sonda Album-P	100	0,15	0,03	3
			água qsp	10
			Total	50

Anexo 4 - Sequências de primers e sondas para detecção de HTLV

Gene	Primers/sondas	Sequência
POL	HTLV-1 F	GAACGCTCTAATGGCATTCTTAAAACC
	HTLV-1 R	GTGGTTGATTGTCCATAGGGCTAT
	HTLV-1 P	FAM- ACTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGG-BHQ1
	HTLV-2 F	CAACCCCAACCAGCTCAGG
	HTLV-2 R	GGGAAGGTTAGGACAGTCTAGTAGATA
	HTLV-2 P	Cy5- TGGTCGAGAGAACCAATGGTRTAATCAAAA-BHQ2
TAX	HTLV-1 F	CGGATACCCAGTCTACGTGTT
	HTLV-1 R	CAGTAGGGCGTGACGATGTA
	HTLV-1 P	FAM-CTGTGTACAAGGCGACTGGTGCC-BHQ1
	HTLV-2 F	CGATTGTGTACAGGCCGATTG
	HTLV-2 R	CAGGAGGGCATGTCTGATGTAG
	HTLV-2 P	Cy5-TGTCCCGTCTCAGGTGGTCTATGTTCCA-BHQ2
ALBUMINA	Albumin F	GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA
	Albumin R	GGGCATGACAGGTTTTGCAATATTA
	AlbuminP	HEX-TCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTCTAGGC-BHQ1

[illegible]

Anexo 06 - Planilha de controle de temperatura

HOSPITAL DAS CLÍNICAS – FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR - ROTINAS DIAGNÓSTICAS												
CONTROLE DE TEMPERATURA												
Identificação do Equipamento n°:						Termômetro n°:						
Mês:		Ano: 2022				Setor: <i>Biologia Molecular- Rotinas Diag de Infecções Virais</i>						
Classificação : () Geladeira () Freezer () Ambiente () Banho Maria () Estufa () Outro: _____												
Periodicidade de Verificação: () 1 Vez ao dia (x) 2 Vezes ao dia () 3 Vezes ao dia () 4 Vezes ao dia () 5 Vezes ao dia												
Especificações: Temperatura Máxima:						Temperatura Mínima:						
Data	Hora	Temperatura °C			Obs	Ass	Hora	Temperatura °C			Obs	Ass
		Mínima	Momento	Máxima				Mínima	Momento	Máxima		
1	08:30						16:00					
2	08:30						16:00					
3	08:30						16:00					
4	08:30						16:00					
5	08:30						16:00					
6	08:30						16:00					
7	08:30						16:00					
8	08:30						16:00					
9	08:30						16:00					
10	08:30						16:00					
11	08:30						16:00					
12	08:30						16:00					
13	08:30						16:00					
14	08:30						16:00					
15	08:30						16:00					
16	08:30						16:00					
17	08:30						16:00					
18	08:30						16:00					
19	08:30						16:00					
20	08:30						16:00					
21	08:30						16:00					
22	08:30						16:00					
23	08:30						16:00					
24	08:30						16:00					
25	08:30						16:00					
26	08:30						16:00					
27	08:30						16:00					
28	08:30						16:00					
29	08:30						16:00					
30	08:30						16:00					
31	08:30						16:00					
LEGENDA: A - ABERTURA DO EQUIPAMENTO VÁRIAS VEZES B - MANUTENÇÃO CORRETIVA C – LIMPEZA D - OUTRO:												
REVISÃO DO CHEFE DE SETOR:												
1ª SEMANA A ASS: 2ª SEMANA A ASS: _____ DATA: ____/____/____												
3ª SEMANA A ASS: 4ª SEMANA A ASS: _____ DATA: ____/____/____												
5ª SEMANA A ASS: _____ DATA: ____/____/____												
OBS: SE A TEMPERATURA ESTIVER FORA DAS ESPECIFICAÇÕES, AVISAR O RESPONSÁVEL.												
Realizar comentários e análise de ação corretiva (quando houver), abaixo e/ou no verso da planilha, indicando o dia, a hora e ciência do responsável.												
Observações: _____												

ANEXO 3 – RELATÓRIO TÉCNICO

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu**

ISABELA CRISTINA DE OLIVEIRA SOUZA FERREIRA

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM DIAGNÓSTICO MOLECULAR
CONFIRMATÓRIO PARA A DETECÇÃO DO HTLV 1 E HTLV-2 NO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU**

Botucatu

2025

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu**

ISABELA CRISTINA DE OLIVEIRA SOUZA FERREIRA

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM DIAGNÓSTICO MOLECULAR CONFIRMATÓRIO
PARA A DETECÇÃO DO HTLV- 1 E HTLV-2 NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientadora: Profa. Dra. Rosana Antunes da Silveira

Laboratório de Biotecnologia Aplicada – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de
Botucatu – LBA/HCFMB

Botucatu

2025

1. INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. O HTLV-1 está associado a diversas manifestações clínicas, incluindo a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), além de alterações dermatológicas, pulmonares, oftalmológicas e reumáticas (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982; Gessain *et al.*, 1985). Por outro lado, o HTLV-2, embora menos frequentemente relacionado a doenças, tem sido associado a algumas alterações neurológicas (Hall *et al.*, 1994).

O HTLV-1 e HTLV-2 são os subtipos mais bem estudados, podendo o HTLV-1 infectar preferencialmente células CD4+, além de infectar linfócitos B, células endoteliais, células mieloides, fibroblastos e linfócitos TCD8+ (Ho *et al.*, 1984; Koyanagi *et al.*, 1993; Longo *et al.*, 1984; Yoshikura *et al.*, 1984), enquanto que o HTLV-2 infecta principalmente T CD8+ (Melamed *et al.*, 2014).

Os indivíduos em sua maioria são assintomáticos, porém 5% a 10% apresentam manifestações clínicas, podendo desenvolver sintomas pulmonares, oftalmológicos, dermatológicos, urológicos e neurológicos degenerativos, e nos casos mais graves leucemias e linfomas (Matsuoka, 2007).

O HTLV pode ser transmitido de varias formas, sendo elas: via sexual (normalmente do homem para mulher), via vertical (aleitamento materno, intrauterino ou periparto) e pela transfusão de sangue, hemoderivados contaminados, e com o compartilhamento de objetos perfurocortantes contaminados (Paiva *et al.*, 2015). Um aspecto relevante é que os *virions* livre são poucos infecciosos, sendo a transmissão eficaz do vírus dependente do contato célula-a-célula (Eusébio-Ponce *et al.*, 2019)

A prevalência do HTLV-1 e HTLV-2 ainda é pouco conhecida. O HTLV-1 é endêmico na América do Sul, Japão, Caribe, África, além de regiões do Oriente Médio e Melanésia, com uma estimativa entre 15 a 20 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2014). Já o HTLV-2 foi identificado em áreas urbanas das Américas, Europa e Ásia, especialmente entre usuários de drogas e populações indígenas da América Latina (Gessain e Cassar, 2012; Carneiro-Proietti, 2015; Bandeira *et al.*, 2021).

Os pacientes com HTLV são susceptíveis a coinfeções com outros vírus. As coinfeções atingem principalmente a população mais vulnerável, como os usuários de drogas injetáveis. A coinfeção do HIV/HTLV-1 acelera a evolução da AIDS, diminuindo a expectativa de vida dos pacientes, enquanto a coinfeção do HIV/HTLV-2 pode oferecer proteção contra a progressão da AIDS. (Brites *et al.*, 2009). As coinfeções pelos vírus da hepatite B e C ainda estão sendo estudadas (Castro e Roger, 2016).

No Brasil, desde 1993, a detecção de HTLV-1 e HTLV-2 foi incorporada à triagem sorológica obrigatória de agentes infecciosos realizada em bolsas de sangue (Brasil, 1993). Em 2009 a triagem passou ser obrigatório para receptores e doadores de órgão. (Brasil, 2009). E atualmente em 2024, houve a incorporação no Sistema único de Saúde (SUS) a testagem sorológica em gestante no pré-natal (Brasil, 2024).

O diagnóstico laboratorial de HTLV divide-se em testes de triagem e confirmatórios. Os exames de triagem são baseados na detecção de anticorpos contra HTLV-1/2 no plasma ou soro, sendo: reação imunoenzimática (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay* ou EIA, *enzyme immunoassay*), aglutinação de partículas (PA, *particle agglutination*) e quimioluminescência (CLIA, *chemiluminescent assay*). Os testes confirmatórios podem identificar anticorpos: Western Blot (WB) e imunoensaio em linha (LIA, *line immunoassay*). E ainda, testes baseados na amplificação do material genético proviral: reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). É recomendável que os resultados positivos na triagem sorológica sejam confirmados para exclusão de possíveis falso-positivos, uma vez que se tratam de testes com alta sensibilidade (Rosadas *et al.*, 2021). Assim, na maioria dos países o ELISA é utilizado com teste de triagem e WB e PCR são utilizados com teste de confirmatório (Bandeira *et al.*, 2021).

Portanto, os testes sorológicos de triagem não diferenciam se a infecção é causada por HTLV-1 e HTLV-2, sendo necessários testes de elevada especificidade para realizar tal distinção, principalmente pelo fato de doenças como HAM e ATLL causadas pelo HTLV-1 terem alta morbidade e mortalidade (Brasil, 2021). Assim, a implantação de um teste diagnóstico molecular para detecção de HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) foi essencial para a confirmação e a definição do tipo viral proporcionando melhorias no tratamento dos indivíduos infectados.

2. OBJETIVO GERAL

O O objetivo desse estudo foi implementar um teste molecular confirmatório para detecção e diferenciação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2. Para isso, foi realizada a padronização do processo de extração de ácidos nucleicos, seguida de uma otimização da metodologia para a diferenciação do subtipo viral. Posteriormente, foram realizadas validações analíticas do teste, e ao final foi elaborado um procedimento operacional padrão (POP) contendo as etapas do fluxo de trabalho como solicitação, coleta, recebimento e processamento de amostras e liberação dos resultados.

3. MATERIAL

3.1 Metodologia Proposta

As amostras foram provenientes de pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Infectologia e de doadores de sangue do HCFMB. O material genético foi extraído por coluna de sílica e foi utilizado em um ensaio de PCR em tempo real multiplex qualitativo com metodologia “*in house*” para detecção e diferenciação simultânea de HTLV-1 e HTLV-2. Após a otimização do ensaio foram empregados testes de validação analítica.

3.2 Desenho do estudo

Neste estudo, está prevista a coleta de amostras de sangue total de pacientes e doadores de sangue, foi dividida nos seguintes grupos:

Grupo 1: Amostras de pacientes positivos ou inconclusivos para HTLV por sorologia em acompanhamento no Ambulatório de Infectologia do HCFMB.

Grupo 2: Amostras de doadores de sangue em triagem sorológica para HTLV, com com técnica em comparação ao ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories) realizado realizada no Hemocentro do HCFMB.

Grupo 3: Amostras de pacientes co-infectados por HTLV e HIV, sendo amostras excedentes processadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA) pertencente à Rede Nacional de Carga Viral do HIV/HBV/HCV do Ministério da Saúde.

Grupo 4: Amostras de pacientes coinfetados por HIV, HBV e/ou HCV, sendo amostras excedentes processadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA), pertencente à Rede Nacional de Carga Viral do Ministério da Saúde.

4. METODOLOGIA

4.1 Extração do material genético

A coleta das amostras de sangue foi realizada por enfermeiras dos serviços de saúde e, posteriormente, encaminhada ao laboratório para processamento. Foram coletados 4 mL de sangue total em tubos contendo o anticoagulante EDTA, devidamente identificado com o nome e a data de nascimento do paciente. No laboratório os tubos foram etiquetados com o número sequencial interno, sendo realizada a dupla checagem para que não ocorram erros de identificação das amostras.

Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação a 2900 rpm por 5 minutos, permitindo a separação do plasma e dos leucócitos do sangue periférico. Posteriormente, foi adicionado 14 mL de solução tampão de lise de eritrócitos [10 mM de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3), 144 mM cloreto de amônio (NH_4Cl) em 1L de água ultrapura] em um tubo Falcon, seguido de agitação em gangorra por 10 minutos e centrifugação a 2900 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado e ressuspenso em 250 μL do tampão de lise e armazenado a -70°C para extração de DNA.

Após a identificação e separação das amostras, foi registrada as informações: nome do paciente, data da coleta e numeração sequencial de coleta das amostras de HTLV na planilha destinada a este fim.

Para a extração por coluna de sílica, inicialmente, as amostras foram centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, seguida da remoção do sobrenadante. Em seguida, foi acrescentados 140 μL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), 20 μL de Proteinase K(20mg/mL)(Loccus, Sao Paulo, Brasil) e 560 μL de Cobas ®Omni Lysis Reagent (Roche Molecular Systems, CA, USA). A solução foi homogeneizada em vórtex e incubada por 10 minutos à 56°C .

Posteriormente, foi acrescentados 560 μL de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido de homogeneização em vórtex. A solução foi transferida para uma coluna de sílica em alíquotas de 630 μL e submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto, repetindo-se o processo para garantir uma absorção completa.

As etapas de lavagem foi realizadas com 500 μL do reagente Cobas® Omni Wash (Roche Molecular Systems, CA, EUA), seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. O procedimento foi repetido novamente com 500 μL do mesmo reagente, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos, uma última centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por 1 minuto.

O material genético na coluna de sílica foi eluído em 60 µL de Buffer AE elution buffer 15mL (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e submetido à centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Ao final do processo de remoção, o DNA eluído foi armazenado no freezer a -20 °C.

4.2 Diluição

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) permitindo a concentração e pureza do material genético.

Primeiramente, foi realizada a calibragem do equipamento com o “branco”, com a mesma solução tampão da etapa de eluição. Assim, deve-se clicar em “Measure”, pipetar 2 µL no DNA eluído no pedestal e iniciar a leitura, clicando em “Measure”. Posteriormente, foi efetuada a limpeza dos pedestais com lenço macio entre as leituras e com Água Mili-Q e lenço macio após o término das leituras. A concentração dos padrões de quantificação foi expressa em ng/µL, se o resultado for inferior a 100 ng/µL, deve-se pipetar 9,5 µL de DNA diretamente na reação de qPCR,. E em caso de concentração superior a 100 ng/µL, o DNA foi previamente diluído, com a fórmula ($C_1.V_1 = C_2.V_2$), para uma concentração de 100 ng/µL.

4.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A detecção do DNA proviral do HTLV-1 e HTLV-2 por qPCR foi realizada utilizando o sistema de sondas de hidrólise (TaqMan®), para o gene *TAX* e *POL* e o gene da albumina como controle endógeno, as sequências descritas no Quadro

Quadro 1. Primes e sondas utilizado no ensaios multiplex qPCR HTLV para detecção de HTLV-1 e HTLV-2

Genes	Primers/sondas	Sequência (5'-3')	Localização
POL	HTLV-1 F	GAACGCTCTAATGGCATTCTTAAAACC	4.788-4.814
	HTLV-1 R	GTGGTTGATTGTCCATAGGGCTAT	4.895-4.872
	HTLV-1 Pb	FAM- ACTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGG	4.828-4.857
	HTLV-2 F	CAACCCACCCAGCTCAGG	4.740-4.757
	HTLV-2 R	GGGAAGGTTAGGACAGTCTAGTAGATA	4.830-4.804
	HTLV-2 Pb	Cy5- TGGTCGAGAGAACCAATGGTRTAATCAAAA	4.760-4.789
TAX	HTLV-1 F	CGGATACCCAGTCTACGTGTT	4.359-7379
	HTLV-1 R	CAGTAGGGCGTGACGATGTA	7.458-7.439
	HTLV-1 Pb	FAM-CTGTGTACAAGGCGACTGGTGCC	7.386-7.408
	HTLV-2 F	CGATTGTGTACAGGCCGATTG	7.272-7.292
	HTLV-2 R	CAGGAGGGCATGTCGATGTAG	7.347-7.327
	HTLV-2 Pb	Cy5-TGTCCCGTCTCAGGTGGTCTATGTTCCA	7.294-7.321
Albumina	Albumin F	GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA	16.222-16.245
	Albumin R	GGGCATGACAGGTTTTGCAATATTA	16.351-16.327
	Albumin Pb	HEX- TCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTCTAGGC	16.290-16.319

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*; FAM, 6-carboxy-fluorescein; CY5, cyanine dye; HEX, phosphoramidite dye; R, *degenerate base- recognition of A or G bases*.

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2022.

Os primers e sondas são da *Integrated DNA Technologies* (IDT), e devem ser ressuspensos em tampão 1x Tris-EDTA (TE), resultando em uma solução estoque com concentração final de 100 µM. A partir dessa solução estoque, são preparada uma solução de trabalho por diluição 1:10, adicionando-se 10 µL da solução estoque a 90 µL de água ultrapura.

As soluções de trabalho são utilizadas na preparação do Mix HTLV, que consiste na combinação de todos os primers e sondas. Para os alvos *POL* e *TAX*, na cabine de segurança as soluções são alíquotadas em tubos diferentes, sendo cada uma designada a um tubo específico. Os volumes preparados são adequados para a realização de 200 testes, conforme descrito nos Tabela 1 e 2 a seguir.

Tabela 1. Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene *POL*.

Para Pol - HTLV	[Estoque uM]	[final na PCR (uM)]	Volume reação	Volume para 200 testes
Primer HTLV1-F	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-F	100	0,6	0,12	24
Primer HTLV-2-R	100	0,5	0,1	20
Primer HTLV-1-P	100	0,15	0,03	6
Primer HTLV-2-P	100	0,15	0,03	6
Primer Album-F	100	0,05	0,01	2
Primer Album-R	100	0,1	0,02	4
Primer Album-P	100	0,15	0,03	6
			Total	100

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*.

Tabela 2. Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene *TAX*.

Para Pol - HTLV	[Estoque uM]	[final na PCR (uM)]	Volume reação	Volume para 200 testes
Primer HTLV-1-F	100	0,2	0,04	8
Primer HTLV-1-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-F	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-2-R	100	0,4	0,08	16
Primer HTLV-1-P	100	0,15	0,03	6
Primer HTLV-2-P	100	0,15	0,03	6
Primer Album-F	100	0,05	0,01	2
Primer Album-R	100	0,1	0,02	4
Primer Album-P	100	0,15	0,03	6
			Total	80

Legenda: F, *Forward*; R, *Reverse*; Pb, *Probe*.

Primeiramente, deve retirar os reagentes do freezer e descongelar, para a realização dos ensaios multiplex de qPCR para a detecção do HTLV-1 e HTLV-2, foram utilizados 10 µL do reagente GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X (Promega, EUA), em conjunto com 0,5 µL do Mix HTLV, contendo os iniciadores e sondas específicas para os genes *POL* e *TAX*, previamente preparados separadamente. O volume total da mistura de reação (10,5 µL) foi distribuído em cada poço da placa, seguido da adição de 9,5 µL de DNA extraído (100 ng/µL), resultando em um volume final de 20 µL por poço.

Cada corrida incluiu 9,5 µL de água livre de nucleases (controles negativos) e acrescentar 5 µL do controle positivo e 4,5 µL de H₂O nos poços correspondentes ao controle positivo (o controle positivo é preparado misturando-se amostras positivas para HTLV-1 e 2 no mesmo tubo). Após a montagem das reações, a placa foi selada com filme adesivo óptico para PCR. Os protocolos detalhados, incluindo os volumes específicos de cada reagente, estão descritos nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

Tabela 3. Protocolo do volume dos reagentes utilizados para o gene POL e albumina para o HTLV-1 e HTLV-2.

Reagentes	Volume (µL) por amostra
Água ultrapura q.s.p	0
kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X	10
Mix de primers e sondas HTLV(POL)+ Albumina	0,5
DNA extraído (100 ng/µL)	9,5
Volume final	20

Tabela 4. Protocolo do volume dos reagentes utilizados para o gene TAX e albumina para o HTLV-1 e HTLV-2.

Reagentes	Volume (µL) por amostra
Água ultrapura q.s.p	0
kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X	10
Mix de primers e sondas HTLV(TAX)+ Albumina	0,5
DNA extraído (100 ng/µL)	9,5
Volume final	20

Na área pós-PCR deve colocar a placa nos equipamentos de PCR em tempo real Bio-Rad CFX Manager v2.3 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA), abrir o programa Bio-Rad CFX Maestro, clicar em “User-defined”, na aba “Protocol”, selecionar a opção HTLV_ciclo, na aba “Plate”, selecionar a opção HTLV_plate e entrar com o número de registro interno da amostra nos poços correspondentes. Será utilizada as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de

50 ciclos de amplificação, consistindo em desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

5. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Para a detecção de HTLV-1 as sondas para os genes *POL* e *TAX* foram desenhadas com o corante repórter FAM. Para HTLV-2 com Cy5 como descrito abaixo:

Quadro 2. Sondas utilizadas para cada gene

FAM	Pol_HTLV1
FAM	Tax_HTLV1
Cy5	Pol_HTLV2
Cy5	Tax_HTLV2
HEX	Albumina

Legenda: FAM, 6 carboxy-fluorescein; Cy5, cyanine dye; HEX, phosphoramidite dye.

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2022.

Após finalizada a corrida, ajustar os valores de *threshold* de acordo com os valores abaixo:

Quadro 3. Sondas e os valores de *threshold*

Alvo	Valor <i>Threshold</i>
FAM	150
HEX	250
Cy5	150

Legenda: FAM, 6 carboxy-fluorescein; Cy5, cyanine dye; HEX, phosphoramidite dye.

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2022.

Avaliar os resultados de qPCR de acordo com os seguintes critérios:

Tabela 5. Interpretação dos resultados por gene para o HTLV-1 e HTLV-2.

	POL	TAX	Resultado
HEX - Albumina (controle endógeno)	20 <Ct< 40	20 <Ct< 40	Válido
	Ct> 40 ou INDETERMINADO	Ct> 40 ou INDETERMINADO	Inválido
FAM	20 <Ct< 40	20 <Ct< 40	HTLV-1 Detectado
	N/A	N/A	Não detectado
Cy5	20 <Ct< 40	20 <Ct< 40	HTLV-2 Detectado
	N/A	N/A	Não detectado

Legenda: FAM, 6 carboxy-fluorescein; Cy5, cyanine dye; HEX, phosphoramidite dye.

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.*, 2022.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os cálculos de média, desvio padrão, variância, coeficiente de variação foram utilizados o Microsoft Excel 2010.

7. RESULTADOS

O ensaio de limite de detecção foi realizado com o plasmídeo contendo 5 alvos (TAX-HTLV1, TAX-HTLV2, POL-HTLV1, POL-HTLV2, ALB). Primeiramente foi realizado um ensaio preliminar com curva de diluição de fator 10, contendo 10^6 a 1 cópia/5 μ L. O último ponto em que todas as amostras foram positivas foi utilizado em um segundo ensaio, de diluição de fator 2 com 20 replicatas. A sensibilidade de (LoD) de 100 moléculas foi determinada para os alvos (POL-HTLV1 e POL-HTLV2) e de 25 moléculas (TAX-HTLV1, TAX-HTLV2). Assim, foi construído uma curva que permitiu a determinação da eficácia do ensaio, a linearidade e o coeficiente de correlação (R^2). Os dados foram analisados no software Bio-Rad CFX Manager v2.3 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os parâmetros de slope, R^2 e eficiência foram analisados para os alvos POL 1, POL 2, TAX 1 e TAX 2, os resultados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Os parâmetros para cada alvo

	HTLV1		HTLV2	
	POL	TAX	POL	TAX
Slope	- 3,58	-3.638	- 3.471	-3.63
R²	0.997	0.996	0.995	-0.997
Eficiência	90.2%	88.3%	94.1%	88.6%

Legenda: R² - Coeficiente de determinação

Para o teste de precisão foram selecionados pontos de diluição do plasmídeo correspondentes a quatro categorias de valores de Ct: alto (Ct ≤ 30), médio (Ct 31-35), baixo (Ct 36-37) e escasso (38-40). Foram realizadas 8 replicatas de cada ponto e três corridas diferentes. Foram avaliadas métricas de repetibilidade dentro de uma mesma corrida e entre corridas diferentes (within-laboratory), os resultados encontrados foram calculados no Excel (Microsoft, 2010) e estão na Tabela 6.

Tabela 7. Avaliação da precisão e reprodução(inter-ensaio) da qPCR, em diferentes concentrações de DNA estimadas em altas, média, baixa e escassa para o alvo HTLV1.

HTLV1								HTLV2								
POL				TAX				POL				TAX				
M	DP	VAR	CV(%)	M	DP	VAR	CV(%)	M	DP	VAR	CV(%)	M	DP	VAR	CV(%)	
Alto	24,24	0,13	0,02	0,52	24,32	0,12	0,01	0,50	26,99	0,14	0,02	0,51	23,97	0,18	0,03	0,74
Médio	32,08	0,12	0,01	0,38	32,27	0,19	0,04	0,60	34,64	0,24	0,06	0,71	31,82	0,13	0,02	0,41
Baixo	36,88	0,92	0,84	2,52	36,67	0,87	0,76	2,38	38,48	0,83	0,69	2,16	36,21	1,00	1,01	2,77
Escasso	37,11	0,91	0,83	2,45	37,93	1,89	3,59	4,99	38,93	0,84	0,70	2,16	37,03	1,00	0,99	2,69

Legenda: Ct- cycle threshold ; DP- desvio padrão; VAR- variância; CV(%) - coeficiente de variância.

A eficiência considerada aceitável deve estar na faixa de 80% a 120%. O slope da curva de calibração, por sua vez, deve variar entre -3,1 e -3,6, sendo o valor ideal -3,32, o que corresponde a uma eficiência de 100%. Além disso, o coeficiente de determinação (R²) deve ser igual ou superior a 0,98, indicando boa linearidade da curva. (Bustin *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2013; Kralik e Ricchi, 2017).

No presente estudo, as eficiências, slope e o R² para o alvo gene POL estiveram dentro do intervalo aceitável, indicando um bom desempenho da reação. Para o alvo TAX o valor da eficiência foi < 90%, porém ainda dentro da faixa aceitável. No entanto, os valores de slope e coeficiente de determinação (R²) foram dentro dos intervalos considerados aceitáveis, indicando que a reação desenvolvida é adequada e válida para aplicação no ensaio de qPCR para o HTLV-1/2.

Na análise dos ensaios de precisão, os valores de variância obtidos foram inferiores a 1, e os coeficientes de variação (CV%) estiveram na faixa de 3% a 10%, considerados aceitáveis conforme os critérios de outros estudos (Gonçalves, 2022; Rosadas *et al.*, 2013; Dehée *et al.*, 2002; Estes e Sevall, 2003; Moens *et al.*, 2009).

No Grupo 1, a qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado detectado em 40% (n=4) das amostras e não detectado em 60% (n=9).

No Grupo 2, a qPCR_HTLV1/2 desenvolvida apresentou resultado não detectado em 75 amostras. Todos foram não reagentes também pelo ensaio ARCHITECT rHTLV-I/II (Abbott Laboratories)(ensaio de detecção do Hemocentro) mostrando 100% (n=75) de especificidade no teste molecular. No período em que as amostras foram coletadas não houve doadores de sangue reagentes para HTLV pelo teste sorológico.

No Grupo 3, a qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado não detectado em 54 amostras, e 3 amostra como detectado (prevalência de 5,2%).

E no Grupo 4, a qPCR_HTLV1/2 apresentou resultado não detectado em 37 das amostras e 2 amostras foram detectadas para HTLV-2 (prevalência de 5,1%) (sendo HIV/HCV/HBV/HTLV n=1, HIV/HCV/HTLV n=1).

8. IMPACTO SOCIAL

Neste trabalho foi validado um método “*in house*” utilizando a técnica de PCR em tempo real para detecção e diferenciação do HTLV-1 e HTLV-2. As análises mostraram que o método pode ser incorporado como diagnóstico molecular confirmatório no HCFMB, permitindo a exclusão de casos falso-positivos por testes sorológicos de triagem e a detecção de casos positivos, possibilitando o acompanhamento clínico dos pacientes, principalmente nos casos de HTLV-1, com o risco de evolução para a HAM e ATLL. Assim, essa abordagem contribui para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes infectados, diminui os custos do SUS e beneficia a sociedade como um todo.

9. REAGENTES

Tabela 8. Reagentes utilizados e seus respectivos fabricantes e lotes

Reagente	Fabricante	Lote
Tampão de lise de eritrócitos	<i>In house</i>	-
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	<i>In house</i>	-
Cobas ®Omni Lysis Reagent 07140622001-03	Roche Molecular Systems	
Etanol absoluto	Merck	1 1153783123
Cobas® Omni Wash	Roche Molecular Systems	(10) M08158
Buffer AE elution buffer 15mL	Qiagen GmbH	148034500
Proteinase K	Loccus	7032
kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix dUTP 2X 0000423556	Promega	

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As atividades desenvolvidas possibilitaram o desenvolvimento e validação do PCR em tempo real para detecção e diferenciação do HTLV-1 e HTLV-2, para as regiões do genoma *POL* e *TAX*, contribuindo diretamente com a confirmação e acompanhamento dos pacientes com HTLV.

REFERÊNCIAS

BANDEIRA, L. M.; PUGA, M. A. M.; MOTTA-CASTRO, A. R. C. Infecção pelo HTLV: uma visão geral. 2021.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.104p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria nº 721/GM, de 09.08.89, que aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 dez. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2009. Seção 1, p. 77.

BRITES, C.; SAMPALO, J.; OLIVEIRA, A. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. **AIDS Rev**, v. 11, n. 1, p. 8-16, 2009.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. HTLV Cadernos Hemominas. Belo Horizonte: **Fundação Hemominas**, 2015. 651 p.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 499-508, 2002.

CASTRO, E.; ROGER, E. Hepatitis C virus/human T lymphotropic virus 1/2 co-infection: Regional burden and virological outcomes in people who inject drugs. **World Journal of Virology**, v. 5, n. 2, p. 68, 2016.

DEHÉE, Axelle et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **Journal of virological methods**, v. 102, n. 1-2, p. 37-51, 2002.

EUSEBIO-PONCE, E. et al. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 32, n. 6, p. 485, 2019.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **The Lancet**, v. 326, n. 8452, p. 407-410, 1985.

- GESSAIN, Antoine; CASSAR, Olivier. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 388, 2012.
- GONÇALVES, M. G.; FUKASAWA, L. O.; CAMPOS, K. R.; HIGA, F. T.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Development and validation of multiplex quantitative real-time PCR assays for simultaneous detection and differentiation of HTLV-1 and HTLV-2, using different PCR platforms and reagent brands. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 831594, 2022.
- HALL, William W. et al. Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. In: **Seminars in virology**. Academic Press, 1994. p. 165-178.
- HO, D. D.; ROTA, T. R.; HIRSCH, M. S. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 81, p. 7588–7590, 1984.
- JOHNSON, G.; NOLAN, T.; BUSTIN, S. A. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. **Methods Mol. Biol.**, v. 943, p. 1–16, 2013.
- KRALIK, Petr; RICCHI, Matteo. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 108, 2017.
- KOYANAGI, Y. et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, v. 196, p. 25–33, 1993.
- LONGO, D. L. et al. Isolation of HTLV-transformed B-lymphocyte clone from a patient with HTLV-associated adult T-cell leukaemia. **Nature**, v. 310, p. 505–506, 1984.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-280, 2007.
- MELAMED, A. et al. Clonality of HTLV-2 in natural infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1004006, 2014.
- MOENS, Britta et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3682-3691, 2009.
- PAIVA, A.; CASSEB, J. 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. 1-14, 2015.
- POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, p. 7415-7419, 1980.
- ROSADAS, Carolina et al. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of virological methods**, v. 193, n. 2, p. 536-541, 2013.

ROSADAS, C. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, 2021.

VIANA, G. M. C. et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, p. 50-53, 2014.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 6, p. 2031-2035, 1982.

YOSHIKURA, H. et al. Isolation of HTLV derived from Japanese adult T-cell leukemia patients in human diploid fibroblast strain IMR90 and the biological characters of the infected cells. **International Journal of Cancer**, v. 33, p. 745–749, 1984.