



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

VANESSA DA SILVA BRITO

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPOS 1 E 2**

TESE DE DOUTORADO

SALVADOR

2018

VANESSA DA SILVA BRITO

**AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPOS 1 E 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro-Filho

Salvador

2018

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

B862 Brito, Vanessa da Silva

Avaliação do diagnóstico sorológico da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipos 1 e 2. / Vanessa da Silva Brito. – 2018.

102f.: il. Color; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Bemardo Galvão Castro-Filho

Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Inclui bibliografia

1. Desempenho. 2. Diagnóstico sorológico. 3. HTLV. 4. Acurácia.

I. Título.

CDU: 616.9

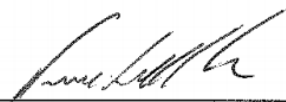
VANESSA DA SILVA BRITO

**“AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANA TIPOS 1 E 2”**

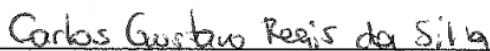
Tese apresentada à Escola
Bahiana de Medicina e Saúde
Pública, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Doutora em
Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 20 de julho de 2018.

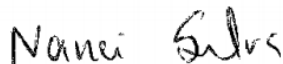
BANCA EXAMINADORA



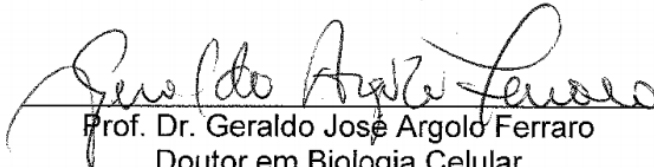
Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos
Doutor em Biociências e Biotecnologias em Saúde
Instituto Gonçalo Moniz, IGM



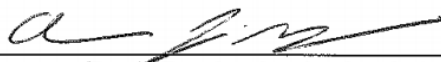
Prof. Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva
Doutor em Bioquímica e Imunologia
Instituto Gonçalo Moniz, IGM



Prof.ª Dr.ª Nanci Ferreira da Silva
Doutora em Ciências da Saúde
Universidade Salvador, UNIFACS



Prof. Dr. Geraldo José Argolo Ferraro
Doutor em Biologia Celular
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Amâncio José de Souza
Doutor em Plant & Microbial Biology
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

AGRADECIMENTOS

À Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) pela oportunidade.

Ao Centro Integrado e Multidisciplinar de HTLV (CHTLV) da EBMSP e funcionários.

Aos pacientes do CHTLV da EBMSP pela colaboração.

Ao orientador Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro-Filho pela competência científica e orientação dada, oportunizando a realização deste trabalho. Gratidão também pela humanização durante todo o processo, o que me fez admirá-lo ainda mais.

Aos Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos, Prof. Dr. Ney Cristian Amaral Boa Sorte e Profa. Dra. Thessika Hialla Almeida Araújo pelo apoio fundamental na finalização do manuscrito.

À Profa. Dra. Maria Fernanda Grassi que tem me acompanhado e apoiado em minha trajetória acadêmica.

À Noilson Lazaro Gonçalves pelas suas contribuições e disponibilidade em ajudar sempre.

À Claudio Paulo dos Santos pelo apoio na execução do projeto.

À Dra Adele Caterino de Araújo pelo apoio nos procedimentos e discussões.

À Dra Maria Luisa Soliani pelo olhar educador à sua equipe, oportunizando que cresçamos juntos.

Ao Prof. Dr. Geraldo José Argolo Ferraro pela pessoa maravilhosa que me ensina muito todos os dias, admirando-o sempre.

À Viviane Ferreira de Matos pela amizade, sempre buscando ajudar no que fosse necessário.

À Profa. Dra. Caroline Alves Feitosa pelo carinho com o qual tranquiliza todos nós.

A todos os colegas da EBMSP que me apoiaram nessa trajetória.

Aos meus colegas de doutoramento, em especial Léa Maria dos Santos Lopes.

À minha maravilhosa família, pelo insubstituível apoio em cada minuto.

Aos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O desenvolvimento desta tese somente foi possível com o apoio de todos vocês.

RESUMO

O diagnóstico da infecção pelo HTLV pode ser realizado através de testes de triagem, seguidos de testes confirmatórios sorológicos e testes moleculares. Devido à heterogeneidade do desempenho relatado pelos testes para triagem para esta infecção e a necessidade de uma avaliação sistemática dos testes comerciais, este estudo tem o objetivo de analisar a acurácia diagnóstica dos testes comerciais de triagem e avaliar os testes confirmatórios sorológicos. Neste estudo de acurácia diagnóstica de fase II, utilizou-se 416 amostras anonimizadas de biorepositório, formando um painel de estudo. Foram avaliados os testes comerciais de triagem sorológica Gold ELISA HTLV-1/2, ELISA Murex HTLV-1/2, SYM Solution anti-HTLV-1/2 e Architect rHTLV-1/2, e os testes confirmatórios comerciais WB 2.4 e INNO-LIA. Todos testes de triagem mostraram 100% de sensibilidade e especificidade > 90% nos testes de ELISA e 98,1% no *chemiluminescence immuno assays (CLIA)*. Os valores do parâmetro *area under the curve* (AUC) foram > 97%. O parâmetro *odds ratio* diagnóstico (ORD), revelou valores altos para os testes de triagem. O teste INNO-LIA classificou 85% das amostras de resultado indeterminado no WB, demonstrando boa capacidade discriminatória. Concluímos que os testes comerciais para triagem sorológica para HTLV-1/2 usados no Brasil são seguros para detecção desta infecção. Sendo o teste Gold HTLV-1/2 o que possui os melhores parâmetros de desempenho entre os testes ELISA. No entanto, quando o CLIA é analisado em conjunto, o Architect rHTLV-1/2 apresentou o maior desempenho dentre os testes de triagem. O teste INNO-LIA é a melhor escolha dentre os testes confirmatórios sorológicos. São necessários mais estudos de acurácia diagnóstica dos testes de triagem para HTLV-1/2 empregando RV, ORD e AUC como parâmetros de análise do desempenho, especialmente no Brasil que apresenta taxas elevadas dessa infecção, em especial para os testes Gold ELISA e SYM Solution.

Palavras chave: HTLV. Diagnóstico sorológico. Desempenho. Acurácia.

ABSTRACT

The diagnosis of HTLV infection is performed through screening tests, followed by confirmatory serological tests and molecular tests. Due to the heterogeneity of the performance reported by the screening tests for this infection and the need for a systematic evaluation of the commercial tests, this study aims to analyze the diagnostic accuracy of the commercial screening tests and to evaluate the serological confirmatory tests. In this phase II diagnostic accuracy study, 416 anonymized samples of a biorepository were used, forming a study panel. The commercial ELISA tests were ELISA HTLV-1/2, ELISA Murex HTLV-1/2, SYM Solution anti-HTLV-1/2 and Architect rHTLV-1/2, and the commercial confirmatory tests were: WB 2.4 and INNO -LIA. All screening tests showed 100% sensitivity and specificity higher than 90% in ELISA tests and 98.1% in chemiluminescence immuno assays (CLIA). The Area under the curve (AUC) values were > 97%. The diagnostic odds ratio (DOR) parameter revealed high values for the screening tests. The INNO-LIA test classified 85% of the indeterminate samples in Western Blot, showing good discriminatory capacity. We concluded that the commercial tests for serological screening for HTLV-1/2 used in Brazil are safe for detecting this infection. The Gold HTLV-1/2 test is the one that has the best performance parameters among the ELISA tests. However, when the CLIA is analyzed together, the Architect rHTLV-1/2 presented the highest performance among the screening tests. The criteria for interpretation of the results of the two confirmatory tests need to be reviewed. Especially for Gold ELISA and SYM Solution, other diagnostic accuracy studies of HTLV-1/2 screening using LR, DOR, and AUC as performance parameters are required.

Key words: HTLV. Diagnostic serological. Performance. Accuracy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do vírus linfotrófico de células T humana do tipo 1.....	15
Figura 2 - Representação esquemática dos genomas dos HTLV-1 e HTLV-2, mostrando as proteínas codificadas por seus respectivos genes.....	16
Figura 3 - Representação esquemática do ensaio imunoenzimático ligado a enzima (ELISA) em formato duplo de sanduíche de antígeno.....	20
Figura 4 - Representação esquemática do immuno chemiluminescence assays (CLIA) em formato duplo de sanduíche de antígeno da marca Architect rHTLV-1/2 (Abbott Laboratories).....	22
Figura 5 - Representação esquemática dos métodos WB e LIA e perfil de bandas apresentados nos ensaios de Western blot 2.4 e no INNO-LIA.....	25
Figura 6 - Fluxograma que descreve o desenho do estudo de análise de desempenho dos testes de triagem sorológica para HTLV-1/2.....	36
Figura 7 - Índice de reatividade (IR) obtido com amostras de soro reativo (em vermelho) e não-reativo (em azul) para HTLV-1/2.....	41
Figura 8 - Índice de reatividade (IR) obtido com amostras de soro reativo (em vermelho) e não-reativo (em azul) para HTLV-1/2.....	43
Figura 9 - Análise de amostras indeterminadas em WB usando PCR como padrão ouro.....	44
Figura 10 - Índice de reatividade (IR) obtido com amostras de resultado indeterminado no WB para HTLV-1/2 utilizando testes Gold ELISA (em cinza), Murex (em azul), SYM Solution (em verde) e Architect rHTLV-1/2 (em preto).....	45
Quadro 1 - Composição dos testes de triagem sorológica por ELISA (Gold ELISA, Murex, SYM Solution) e CLIA (Architect rHTLV-1/2).....	20
Quadro 2 - Composição dos testes confirmatórios por Western Blot (HTLV BLOT 2.4) e imunoblot (INNO-LIA HTLV I/II), segundo as informações contidas nas bulas dos.....	23
Quadro 3 - Critérios de reatividade de bandas recomendados pelo fabricante para classificação do resultado no WB (HTLV BLOT 2.4).....	24
Quadro 4 - Critérios de reatividade de bandas recomendados pelo fabricante para classificação do resultado no LIA (INNO-LIA).....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxas de resultados soroindeeterminados em testes confirmatórios (WB e/ou LIA) no período de 1994 a 2018.	26
Tabela 2 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes de triagem comercial por ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution).....	39
Tabela 3 - Tabulação cruzada dos resultados do teste de triagem por CLIA (Architect r-HTLV-1/2).....	39
Tabela 4 - Índice de reatividade das amostras positivas para HTLV-1/2 de acordo com o tipo viral nos testes de triagem sorológica.....	42
Tabela 5 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes de triagem comercial por ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution) com o painel de 397 amostras.....	43
Tabela 6 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes de triagem comercial por ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution) e o PCR das amostras com resultado indeterminado no WB.....	44
Tabela 7 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes sorológicos confirmatórios WB 2.4 e INNO-LIA de 58 amostras.	46
Tabela 8 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica das amostras com resultado indeterminado no WB2.4.....	46
Tabela 9 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica das amostras com resultado positivos para HTLV sem discriminação do tipo no WB.4.....	46
Tabela 10 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica no teste INNO-LIA das amostras com resultado indeterminado no WB2.4.....	47
Tabela 11 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica no teste INNO-LIA das amostras com resultado positivos para HTLV sem discriminação do tipo no WB2.4.....	47

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

®	Marca registrada
κ	Índice de Kappa de Cohen
Acu	Acurácia
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATL	<i>Adult T-cell lymphoma</i> / linfoma de células T do adulto
AUC	<i>Area under the curve</i> / área sob a curva
BCIP	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Center for disease control</i> / Centro para Controle de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHTLV	Centro de Referência de Portadores do HTLV
CLIA	<i>Chemiluminescence immuno assays</i> / ensaio imunoquimioluminescente
CTL	Linfócitos T citotóxicos
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> / ensaio de imunoabsorção enzimática
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOR	<i>Diagnostic odds ratio</i> (mesmo que <i>odds ratio</i> diagnóstico – ORD)
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>env</i>	Gene viral que codifica envelope viral
Esp	Especificidade
EUA	Estados Unidos da América
FBDC	Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
<i>gag</i>	Gene viral que codifica as proteínas estruturais
GD21	Proteína recombinante contendo o epítipo imunodominante da gp 21
GLUT-1	Transportador de glicose-1
gp21	Glicoproteína que compõe a envelope viral codificada por gene <i>env</i>
gp46	Glicoproteína que compõe a envelope viral codificada por gene <i>env</i>
HAM/TSP	<i>HTLV-1-associated myelopathy tropical spastic paraparesis</i> / Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical

HBZ	Proteína viral HTLV-1 bZIP factor
HIV	<i>Human immunodeficiency vírus</i> / vírus da imunodeficiência humana
HTLV	<i>Human T-cell lymphotropic vírus</i> / vírus linfotrópico de células T humanas
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina tipo A
IgG	Imunoglobulina tipo G
IgM	Imunoglobulina tipo M
IL	Interleucina
IR	Índice de reatividade
kD	kilodaltons
K-55	Glicoproteína recombinante do envelope viral
LIA	<i>Online immunoassay</i> / imunoensaio em linha
LR	<i>Likelihood ratio</i>
LTR	<i>Long terminal repeats</i> / Repetições terminais longas
MAD-1	<i>Mitotic arrest deficient-1</i>
MTA-1	Glicoproteínas recombinantes do envelope viral (mesmo que gp46)
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NK	Células natural killer
ORD	Odds ratio diagnóstico (mesmo que <i>Diagnostic odds ratio – DOR</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD:	<i>O-phenylenediamin</i>
p15	Proteína que compõe a estrutura viral codificada por gene <i>gag</i>
p19	Proteína que compõe a estrutura viral codificada por gene <i>gag</i>
p24	Proteína que compõe a estrutura viral codificada por gene <i>gag</i>
p27	Proteína viral reguladora (mesmo que Rex)
p40	Proteína viral reguladora (mesmo que Tax)
PA	<i>Particle agglutination</i> / aglutinação de partículas
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> / células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / reação em cadeia da polimerase
<i>pol</i>	Gene viral que codifica enzimas transcriptase reversa e integrase

<i>pro</i>	Gene viral que codifica protease viral
pX	Região do genoma viral
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> / Reação em cadeia da polimerase quantitativa
Rex	Proteína viral reguladora (mesmo que p27)
rgp21	Glicoproteína 21 recombinante
rgp46-I	Glicoproteína 46 do HTLV-1 recombinante
rgp46-II	Glicoproteína 46 do HTLV-2 recombinante
RIP	Radio imuno precipitação
RLU	<i>Relative Light Units</i> /Unidades Relativas de Luz
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i> / características operacionais do receptor
RV	Razão de verossimilhança
Sen	Sensibilidade
STARD	<i>Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy Studies</i>
Tax	Proteína viral reguladora (mesmo que p40)
TBM:	<i>Tetramethylbenzidine</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> / Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	<i>Tumor necrotic fator alpha</i> / fator de necrose tumoral alpha
UDI	Usuários de drogas intravenosas
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
WB	<i>Western blot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1	Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV)	15
3.2	Ciclo do vírus e resposta imunológica da infecção pelo HTLV	17
3.3	Diagnóstico laboratorial do HTLV	19
3.3.1	Diagnóstico sorológico de triagem	19
3.3.2	Diagnóstico Sorológico Confirmatório	23
3.3.3	Diagnóstico molecular da infecção pelo HTLV	28
3.4	Estudos de desempenho diagnóstico	28
3.4.1	Sensibilidade e Especificidade	30
3.4.2	Razão de verossimilhança positiva e negativa (RV+ e RV-)	31
3.4.3	Área abaixo da curva ou area under the curve (AUC)	31
3.4.4	Acurácia diagnóstica global	32
3.4.5	Odds ratio diagnóstico (ORD)	32
3.4.6	Índice de Kappa de Cohen (κ)	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Desenho do Estudo	34
4.2	Montagem do Painel	34
4.3	Análise de desempenho dos testes de triagem sorológica	34
4.4	Deteção molecular	36
4.5	Análise do teste confirmatório INNO-LIA	37
4.6	Considerações éticas	37
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6	RESULTADOS	39
6.1	Desempenho dos testes de triagem sorológica com WB 2.4 como padrão ouro	39
6.2	Desempenho dos ELISA com PCR	42
6.3	Análise dos resultados indeterminados	45
6.4	Teste Confirmatório INNO-LIA x WB	45
7	DISCUSSÃO	48
8	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO	98

1 INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e do tipo 2 (HTLV-2) foram identificados em 1980 e 1982, respectivamente^(1,2). O HTLV-1 é o agente etiológico da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)^(3,4), do linfoma de células T do adulto (ATL)^(5,6), da uveíte associada ao HTLV-1⁽⁷⁾, e tem sido associado a uma série de manifestações clínicas como, dermatites infecciosas⁽⁸⁾, artrites^(9,10) e polimiosites⁽¹¹⁾, demonstrando o caráter sistêmico desta infecção. Até o presente momento, não estão claras quais as manifestações clínicas são relacionadas a infecção pelo HTLV-2, embora alguns trabalhos relatem que a infecção por este vírus pode estar associada a desordens neurológicas ou ao aumento na taxa de doenças infecciosas e linfoproliferativas⁽¹²⁻¹⁵⁾. Em 2005 foram descritos os tipos 3 e 4 do HTLV, mas não possuem doenças associadas até o presente momento^(16,17).

A prevalência da infecção pelo HTLV na população geral permanece desconhecida em diversas áreas do mundo, porém, estima-se que pelo menos 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1, com variações relacionadas a região geográfica, padrões sócio-comportamentais e étnicos das populações. As regiões de maior prevalência são Japão, África, Ilhas Caribenhas e Américas Central e do Sul⁽¹⁸⁻²⁰⁾. A infecção pelo HTLV-2 é endêmica na população indígena nativa na América do Norte e do Sul, em algumas tribos de Pigmeus na África e em usuários de drogas intravenosas (UDIs) em áreas urbanas do mundo⁽²¹⁾.

O diagnóstico laboratorial destas infecções é realizado pela detecção de anticorpos específicos dirigidos contra regiões imunodominantes das proteínas estruturais do HTLV-1 e HTLV-2⁽²²⁾. O Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico seja realizado em 03 etapas: triagem sorológica; confirmação sorológica; confirmação molecular para resultados inconclusivos⁽²³⁾. No entanto, após a obrigatoriedade da sorologia para HTLV-1/2 em bancos de sangue no Brasil⁽²⁴⁾, os testes de triagem passaram por várias modificações em sua composição antigênica e formato em virtude da alta sensibilidade global e baixa especificidade para detectar infecção pelo HTLV-2⁽²⁵⁻²⁸⁾.

Os testes sorológicos confirmatórios vem sendo questionados pela posição que ocupa no algoritmo diagnóstico, devido ao seu alto custo, as elevadas taxas de resultados indeterminados, com a prevalência variando entre a população estudada e a endemicidade da

infecção⁽²⁹⁻³⁷⁾ e por apresentarem falhas no diagnóstico de casos verdadeiramente infectados pelo HTLV-2⁽³⁸⁻⁴¹⁾. Visando a redução de custos e garantia do diagnóstico correto, diversos estudos propõem novos algoritmos de diagnóstico para infecção pelo HTLV-1/2^(28,42) demonstrando a necessidade de mais investigações sobre os ensaios confirmatórios.

Nesse cenário, devido à heterogeneidade do desempenho dos testes sorológicos da infecção pelo HTLV-1/2 e a necessidade de uma avaliação sistemática dos testes disponíveis no Brasil, torna-se imprescindível a avaliação de desempenho diagnóstico para posterior contribuição com o aprimoramento dos testes comerciais quanto à sua capacidade de detectar e discriminar estas infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho diagnóstico de testes sorológicos de triagem e confirmatório para HTLV- 1 e 2 comercialmente disponíveis no Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o desempenho diagnóstico de três kits ELISA de 3^a geração e um kit de CLIA em identificar a infecção pelo HTLV-1 e 2;
- Avaliar o desempenho diagnóstico do teste confirmatório INNO-LIA frente ao WB 2.4.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV)

O HTLV é um retrovírus complexo pertencente ao gênero *Deltaretrovirus* e subfamília *Orthoretrovirinae* com estrutura morfológica (Figura 1) similar à de outros retrovírus, com um genoma de RNA de fita simples, composto por genes estruturais e não estruturais (Figura 2). Estes genes são denominados como *gag* (que codifica as proteínas estruturais p19, p24 e p15), *pro* (codifica a protease viral responsável pelo processamento dos produtos Gag maduros), *pol* (codifica as enzimas transcriptase reversa e integrase) e *env* (codifica as glicoproteínas do envelope viral - gp21 e gp46) ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

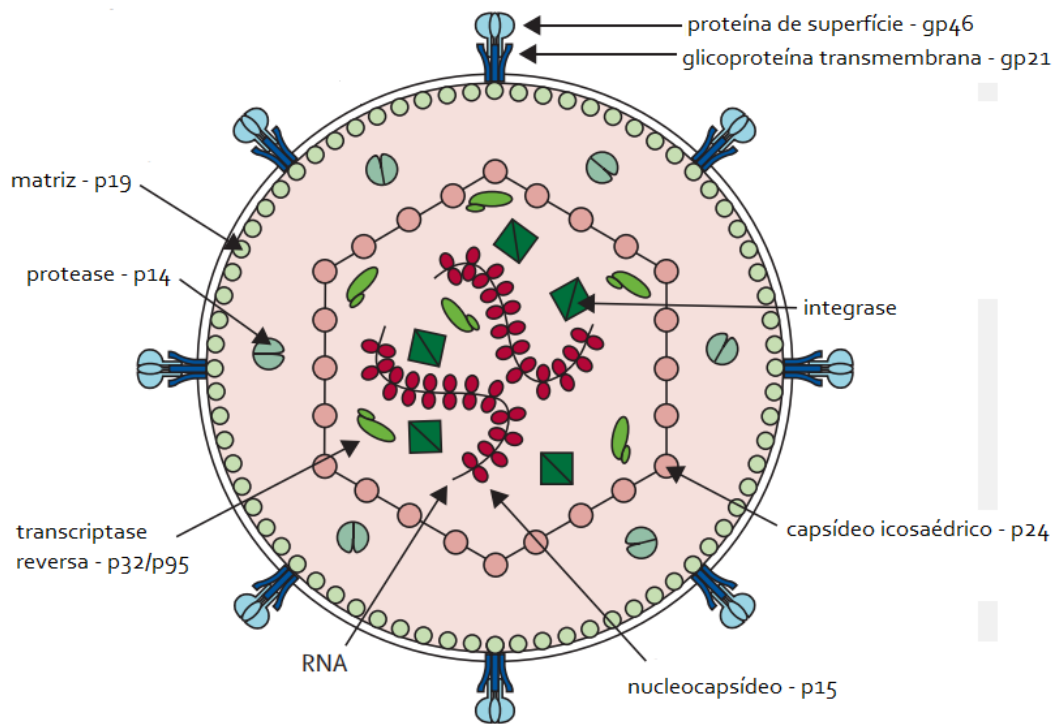


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do vírus linfotrópico de células T humana do tipo 1.

Existe também uma sequência próxima à extremidade 3' chamada região X, que contém os genes que codificam as proteínas reguladoras Tax (p40) e Rex (p27), flanqueados nas extremidades por duas regiões de repetição terminal longa (*long terminal repeats* - LTR), que

estão envolvidas nos processos de infecção e proliferação do vírus, e consequente resposta imunológica e diagnóstico⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

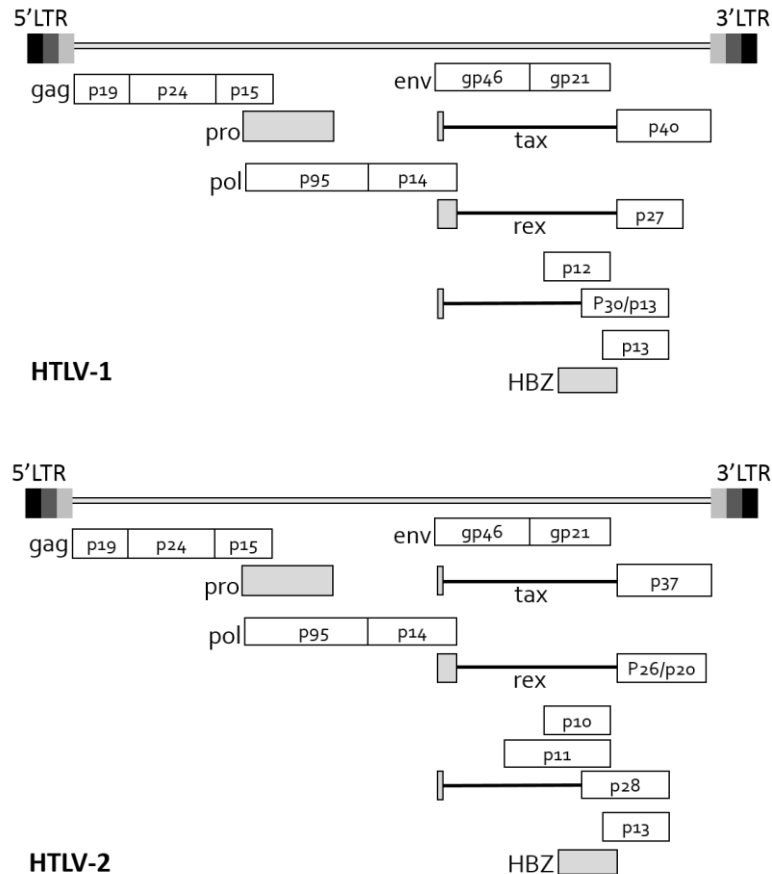


Figura 2 - Representação esquemática dos genomas dos HTLV-1 e HTLV-2, mostrando as proteínas codificadas por seus respectivos genes.

Fonte: Adaptado de Verdonck et al. (2007) e Edwards et al. (2011).

A infecção apresenta prevalência heterogênea, com taxas que diferem de acordo com a área geográfica, características sociodemográficas da população estudada e comportamentos individuais de risco. Atualmente é reportada uma estimativa de que existam em torno de 10 milhões de infectados pelo mundo⁽¹⁹⁾. No Brasil, o HTLV-1 foi identificado pela primeira vez no em 1986⁽⁴⁹⁾ e atualmente está disseminado em todo território nacional, com estimativa de 300-800 mil de portadores⁽¹⁹⁾, apresentando taxas mais elevadas nas regiões Norte e Nordeste, com uma média de 0,41%^(50,51).

Salvador, capital do estado da Bahia, apresenta a maior prevalência de HTLV-1 no país com valores estimados de 1,7% em um estudo de base populacional realizado em 2003⁽²²⁾, e cerca de 0,48-1,3% em doadores de sangue^(52,50). O HTLV-2 circula nesta cidade principalmente

em usuários de drogas intravenosas (UDI)⁽⁵³⁾. A prevalência de HTLV-1 e HTLV-2 em gestantes foi de 0,9% e 0,03%, respectivamente⁽⁵⁴⁾. A triagem para infecções pelos HTLV-1/2 tornou-se obrigatória no Brasil em 1993, porém a triagem para gestantes não é obrigatória no país até o presente momento.

Estes vírus podem ser transmitidos de uma pessoa para a outra por contato sexual, por via parenteral, através da transfusão sanguínea e de hemoderivados⁽⁵⁵⁾, compartilhamento de agulhas contaminadas⁽⁵⁶⁾ e por transmissão vertical, principalmente através da amamentação⁽⁵⁷⁾.

3.2 Ciclo do vírus e resposta imunológica da infecção pelo HTLV

O HTLV-1 estabelece uma infecção crônica, com principal tropismo por linfócitos T CD4+ (*cluster of differentiation 4*), que são os reguladores centrais da resposta imune adquirida. Entretanto, apresenta a capacidade de infectar outras células, como monócitos e linfócitos B⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾.

A infecção inicia-se pela adsorção do vírus no domínio de ligação da glicoproteína de superfície gp46 (de 46 kD) ao receptor celular GLUT-1 e as proteoglicanas heparan sulfato e a neurofilina-1, que auxiliam na penetração celular^(61,62). Após esta interação, a proteína transmembrana gp21 (de 21 kD) promove a fusão do envelope viral com a membrana celular e, em seguida, ocorre à liberação do genoma viral no interior da célula, onde ocorrerá a transcrição do genoma viral de RNA a DNA pela enzima transcriptase reversa, seguida pela inserção do DNA linear viral ao cromossomo hospedeiro mediada pela proteína integrase, dando origem ao provirus^(63,64).

Mediada por enzimas do hospedeiro ocorre a síntese de RNA viral, que leva a formação de um longo transcrito primário, dando origem ao RNA mensageiro (RNAm) e RNA genômico⁽⁶⁵⁾. Este segundo é empacotado e passa pelo processo de maturação, com o processamento proteolítico das proteínas do capsídeo p24 e p15, obtendo-se a partícula viral madura capaz de infectar novas células por proliferação da célula infectada ou pelo mecanismo de “sinapse viral”, que é um processo transferência de partículas virais, proteínas virais e RNA genômico em células alvo novas, através do contato direto célula-a-célula,

proporcionado pela polarização do centro organizador de microtúbulos (MTOC) celular, mediado pela proteína Tax^(66,67).

A proteína viral Tax, além de principal regulador da expansão clonal das células infectadas através do aumento no número de cópias do genoma viral, é o antígeno alvo predominante para respostas dos linfócitos T citotóxicos (CTL)⁽⁶⁸⁾. Esta proteína desempenha importante papel na infecção, pois age estimulando a proliferação celular, além de inibir a apoptose e inativar proteínas atuantes no controle do ciclo celular como p53, p16 e proteína MAD-1 (*mitotic arrest deficient-1*)⁽⁶⁹⁾. Outra proteína viral importante é a HBZ⁽⁷⁰⁾, que antagoniza a ativação da transcrição viral exercida por Tax, participa na transformação celular estimulando a proliferação celular e está relacionada ao mecanismo de escape do vírus da resposta imunológica⁽⁷¹⁾.

De modo geral, a resposta imune contra o vírus é caracterizada por elevados títulos de anticorpos específicos para antígenos virais, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR); expansão clonal independente de IL-2⁽⁷²⁾; aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-6)⁽⁷³⁾, aumento da capacidade migratória dos leucócitos circulantes e do percentual de linfócitos T-CD8+ específicos contra o vírus^(68,74). Estas células atuam na infecção eliminando diretamente as células infectadas, elevando os níveis de citocinas pró-inflamatórias ou suprimindo células T regulatórias e reduzindo os níveis de IL-10 e TGF- β que promovem a inibição da produção de IL-2 e IFN- γ ^(75,66,76).

A interação vírus-hospedeiro apresenta aspectos importantes para o diagnóstico laboratorial, como a eficiência da resposta imune e a taxa de expressão espontânea de antígenos virais. Muitas proteínas virais são imunogênicas e anticorpos contra elas são detectados no soro de pessoas infectadas com o HTLV, viabilizando o diagnóstico laboratorial⁽⁷⁷⁾.

As glicoproteínas do envelope gp46 e gp21, consideradas responsáveis pela indução da resposta humoral em 90% dos indivíduos infectados⁽⁷⁸⁾, são expressas na superfície das células infectadas e são, portanto, as primeiras partículas a serem reconhecidas no curso da resposta imune, de modo que indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolvem uma resposta significativa aos produtos protéicos do gene *env*⁽⁴⁶⁾. Além destas, outras proteínas, codificadas pelo gene *gag*, são utilizadas como marcadores da infecção, como p19 e p24⁽⁷⁹⁾.

3.3 Diagnóstico laboratorial do HTLV

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV é realizado através da detecção de anticorpos específicos, em soro ou plasma, dirigidos contra regiões imunodominantes das proteínas estruturais do vírus HTLV-1 e HTLV-2^(80,81). O Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico seja realizado em 03 etapas: Etapa I - Triagem sorológica, através de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou teste de aglutinação de partículas (PA); Etapa II – Confirmação sorológica, por meio da realização do teste de Western Blot para HTLV-1/2 (WB) ou Imunoensaio de linha (LIA); e Etapa III – Confirmação da infecção pelo HTLV-1/2, por métodos de biologia molecular para detecção do provírus integrado ao DNA das células do sangue periférico por reação em cadeia da polimerase qualitativa e/ou quantitativa (qPCR). O diagnóstico sorológico de triagem pode ser realizado também por *Immuno Chemiluminescence Assays* (CLIA)⁽²³⁾.

3.3.1 Diagnóstico sorológico de triagem

O primeiro ELISA para detecção de anticorpos anti-HTLV-1 foi licenciado nos Estados Unidos em 1988 e recomendado para a triagem em banco de sangue⁽⁸²⁾. No Brasil, tornou-se obrigatória em bancos de sangue em 1993⁽⁸³⁾. Desde então, estes testes passaram por várias modificações em sua composição antigênica e formato^(84,27,85). Os ensaios de triagem atuais detectam simultaneamente a presença de anticorpos anti-HTLV-1 e 2, sem discriminar o tipo viral, diferente dos testes confirmatórios que classificam o tipo viral entre 1 e 2.

Os testes de ELISA de primeira geração eram compostos por proteínas do lisado viral do HTLV-1 como fonte de antígeno⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Os ensaios de 2ª geração melhoraram a sensibilidade e especificidade e possibilitaram a detecção do HTLV-2, pois eram compostos por lisados de HTLV-1, proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos de HTLV-1 e HTLV-2. A maioria dos ensaios de 1ª e 2ª geração usavam o formato de ensaio indireto: os anticorpos anti-HTLV-1/2 eram capturados por proteínas virais imobilizadas e, posteriormente, detectados usando conjugados de anticorpos policlonais para imunoglobulinas humanas.

Atualmente, são utilizados os testes de 3ª geração, que usam um formato duplo de sanduíche de antígeno, composto por proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos, para capturar e detectar diretamente anticorpos anti-HTLV-1/2 (Quadro 1).

Quadro 1 - Composição dos testes de triagem sorológica por ELISA (Gold ELISA, Murex, SYM Solution) e CLIA (Architect rHTLV-1/2).

TESTE	MÉTODO	ANTÍGENO	AC CONJUGADO/SUBSTRATO
Gold ELISA HTLV-1/2	ELISA 3ª geração formato sanduíche de antígeno duplo.	Peptídeos sintéticos e recombinantes de HTLV-1 + HTLV-2.	Antígeno recombinante de HTLV-1 e HTLV-2 conjugado a peroxidase /TMB.
MUREX HTLV-1/2	ELISA 3ª geração formato sanduíche de antígeno duplo.	Peptídeos sintéticos gp46-I e gp46-II; gp21-HTLV-2.	Peptídeos sintéticos gp46-I e gp46-II; e rgp21-HTLV-1 conjugado a peroxidase /TMB.
ANTI-HTLV-1/2 SYM SOLUTION	ELISA 3ª geração formato sanduíche de antígeno duplo.	Peptídeos sintéticos e recombinantes de HTLV-1 + HTLV-2.	Peptídeos sintéticos e recombinantes de HTLV-1 + HTLV-2 conjugado a peroxidase/ TMB.
ARCHITECT rHTLV-1/2	Imunoensaio quimioluminescente formato sanduíche de antígeno duplo.	Partículas magnéticas revestidas com peptídeo sintético de HTLV-1 e micropartículas revestidas com antígeno recombinante de HTLV-2, o peptídeo sintético (gp46) e o antígeno recombinante (gp21).	Peptídeo sintético (gp46) de HTLV-1/HTLV-2 marcado com acridina e antígeno recombinante (rgp21) marcado com acridina/ peróxido de hidrogênio.

OPD: o-fenilenodiamina; TBM: tetrametilbenzidina

Esses testes, embora mais sensíveis que os de gerações anteriores, se mostraram menos específicos⁽⁸⁵⁾, principalmente para a detecção de anticorpos anti-HTLV-2^(39,86,26)(Figura 3).

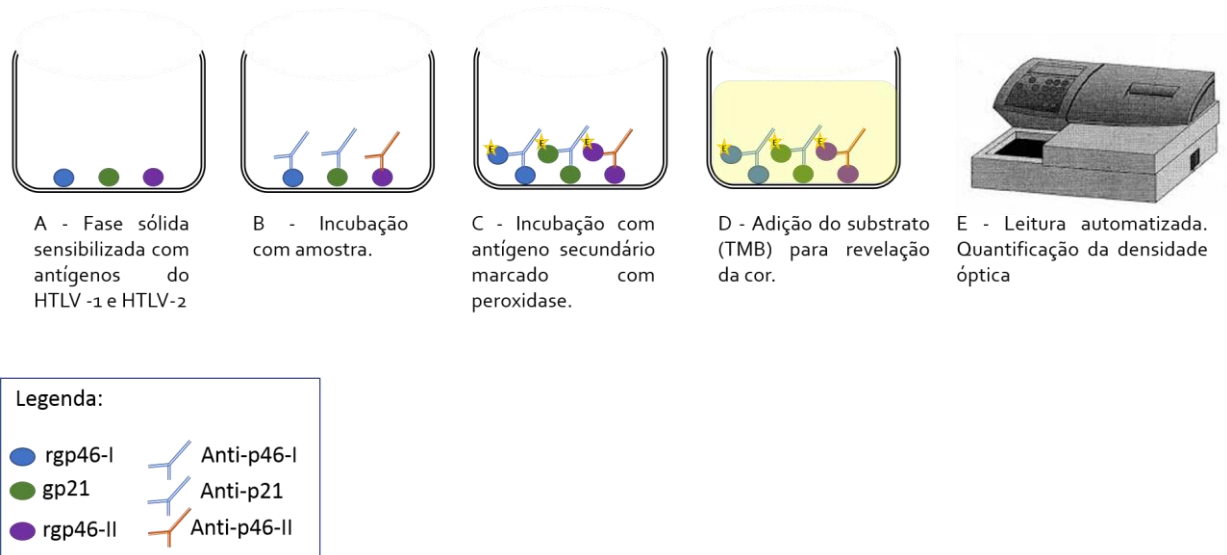


Figura 3 - Representação esquemática do ensaio imunoenzimático ligado a enzima (ELISA) em formato duplo de sanduíche de antígeno.

Fonte: o autor.

Com a retirada do mercado nacional dos testes de 2ª geração e o de 3ª geração *Ortho* HTLV I/HTLV 2 Ab *Capture Test System* um novo desafio se impôs de testar o desempenho de kits de 3ª geração disponíveis no mercado, utilizando populações de diferentes regiões geográficas e de risco epidemiológico. Atualmente estão disponíveis dois kits ELISA que utilizam

proteínas recombinantes de envelope do HTLV-1 e HTLV-2 e proteína transmembrana comum aos dois vírus (Murex e Biokit) e kits nacionais (Gold ELISA e SYM Solution) de método sanduíche (antígeno/anticorpo/antígeno conjugado) que detectam anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2. O resumo do formato e da composição dos kits podem ser observados no Quadro 1 acima.

Outro importante ensaio de triagem sorológica é o método de CLIA, que foi proposto para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2 em 1993⁽⁸⁹⁾. No entanto, desde o início, apresenta alta sensibilidade e a especificidade em constante discussão⁽⁸⁹⁻⁹³⁾. Este imunoensaio, totalmente automatizado, é composto por duas etapas e também utiliza formato de sanduíche de antígeno duplo, combinando as tecnologias de micropartículas paramagnéticas com imunoensaio quimioluminescente de alta transferência.

A primeira etapa combina a amostra teste, o diluente do ensaio e as micropartículas paramagnéticas revestidas com antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos do vírus. Posteriormente os anticorpos anti-HTLV-1/2, caso presentes na amostra, são capturados pelas micropartículas. Na segunda etapa, os anticorpos contra HTLV-1/2, presos á micropartículas, são incubados com antígenos (peptídeo sintético e antígeno recombinante) marcados com acridina. Após lavagem, é adicionado uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio, para liberação do sinal quimioluminescente. A intensidade da quimioluminescência é medida em unidades relativas de luz (RLU), e é proporcional a concentração de anticorpos específicos na amostra⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾ (Figura 4).

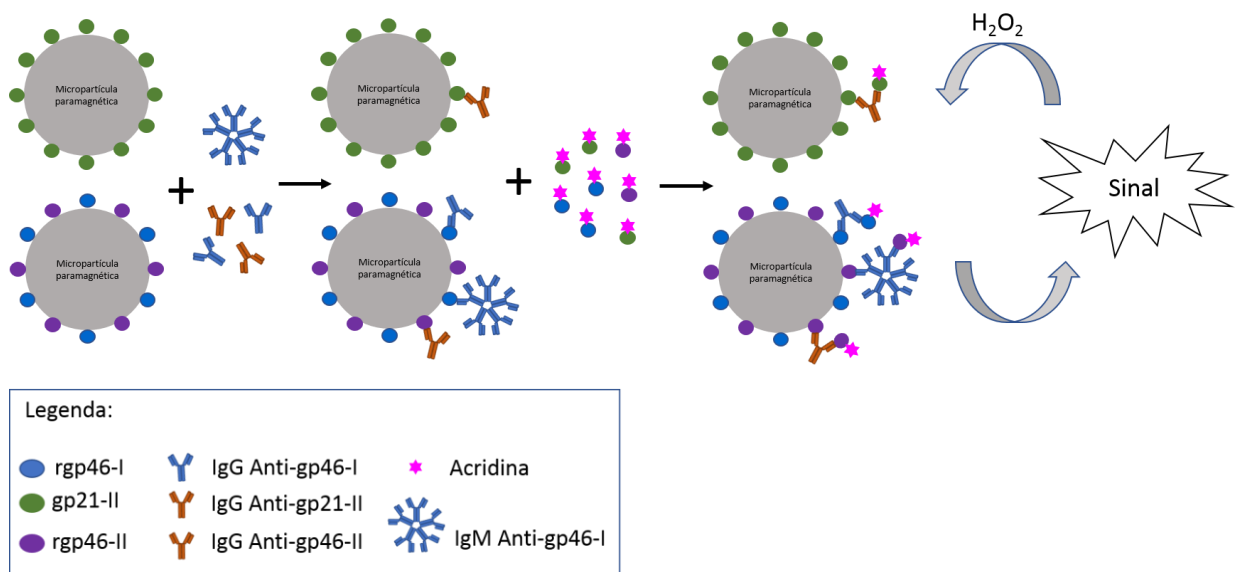


Figura 4 - Representação esquemática do immuno chemiluminescence assays (CLIA) em formato duplo de sanduíche de antígeno da marca Architect rHTLV-1/2 (Abbott Laboratories).

Fonte: Autor, adaptado de Qiu et al, 2008.

Atualmente estão disponíveis os kits comerciais de CLIA: *Architect rHTLV-1/2* (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Alemanha), *Abbott Prism HTLV-1/HTLV-2* (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Alemanha), *Elecsys HTLV-1/2* (Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Suíça), *Liaison XL Murex recHTLV-1/2* (DiaSorin, Saluggia, Itália), *Lumipulse G HTLV-1/2* (Fujirebio, Tóquio, Japão).

O teste Architect rHTLV-1/2 é um imunoensaio quimioluminescente em duas etapas, que utiliza o sistema de análise *Architect i system* e detecta anticorpos contra a proteína recombinante gp21 do HTLV-1 e do HTLV-2 e peptídeo sintético de gp46⁽⁹¹⁾; o *Abbott Prism* é um teste de CLIA em sanduíche de três etapas, que é analisado pelo sistema *Abbott Prism system*, e detecta anticorpos contra os antígenos do HTLV-1 e HTLV-2⁽⁹³⁾; o teste Elecsys é um ensaio em sanduíche duplo antigênico de uma etapa, que pode ser analisado pelos sistemas *Modular Analytics E170* ou *cobas e411, cobas e601, cobas e602*, e detecta anticorpos contra antígenos recombinantes virais gp21 e p24⁽⁹⁶⁾; e o teste *Liaison XL* é um imunoensaio quimioluminescente em dois passos e é composto por antígeno recombinante (gp21) do HTLV-1/2 e dois peptídeos sintéticos (gp46-I e gp46-II) específicos para a região externa do envelope do HTLV-1 ou HTLV-2^(95,97-99); *Lumipulse G*, possui o formato sanduíche de duas etapas composto pelos antígenos recombinantes gp21 e gp46, p19 do HTLV-1, e gp46 e p19 do HTLV-2⁽¹⁰⁰⁾.

Um teste de triagem simples, porém não muito utilizado, é o PA. Neste ensaio as reações caracterizam-se pela utilização de partículas de gelatina sensibilizadas com antígenos virais inativados. Está baseado no princípio de que as partículas sensibilizadas aglutinam-se na presença de anticorpos anti-HTLV-1 que se encontram no soro ou plasma dos indivíduos infectados^(101,102). Estes testes apresentam alta sensibilidade, são de fácil e rápida execução e não requerem equipamentos. Porém, pelo mesmo motivo dos testes de ELISA, podem gerar resultados falso-positivos e detectam apenas infecção pelo HTLV-1. Está disponível comercialmente o kit Serodia HTLV-1 (Fujirebio Inc., Tóquio, Japão)⁽¹⁰³⁾.

3.3.2 Diagnóstico Sorológico Confirmatório

Os testes sorológicos confirmatórios iniciais foram o Western Blot (WB) e a imunofluorescência indireta (IFI)⁽¹⁰⁴⁾. Na década de 1990 foi introduzido o imunoensaio em linha (LIA)⁽¹⁰⁵⁾.

Os testes sorológicos confirmatórios comercializados atualmente para detecção do HTLV-1/2 são: HTLV Blot 2.4 (Genelabs Diagnostics, Science Park, Singapura), Problot HTLV-I (Fujirebio, Tóquio, Japão), INNO-LIA HTLV I/II Score (Innogenetics, Gante, Bélgica)^(106,107). O ensaio HTLV Blot 2.4 é um WB para a confirmação e diferenciação da sororeatividade para HTLV-1 e HTLV-2.

Este teste é composto por tiras de nitrocelulose nas quais são incorporadas proteínas recombinantes rgp46-I, rgp46-II, gp46, GD21 e rgp21 e são detectadas com IgG de cabra anti-humana conjugada com fosfatase alcalina e o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitrozol de tetrazólio (BCIP/NBT) (Quadro 2).

Quadro 2 - Composição dos testes confirmatórios por Western Blot (HTLV BLOT 2.4) e imunoblot (INNO-LIA HTLV I/II), segundo as informações contidas nas bulas dos.

TESTE	MÉTODO	ANTÍGENO	AC CONJUGADO/SUBSTRATO
HTLV BLOT 2.4	Western Blot	HTLV-1 lisado viral + rpg46-I, rpg46-II e GD21	IgG anti-humana conjugado com fosfatase alcalina/ BCIP e NBT
INNO-LIA HTLV I/II	Imunoblot	Peptídeos sintéticos e recombinantes de p19-I/II; p24-I; gp46-I/II; gp21; gp46-I e gp46-II	IgG anti-humana conjugado com fosfatase alcalina/ BCIP e NBT

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato; NBT: nitrozol de tetrazólio

Os critérios de classificação da reatividade das bandas para conclusão dos resultados são mostrados no Quadro 3.

Quadro 3 - Critérios de reatividade de bandas recomendados pelo fabricante para classificação do resultado no WB (HTLV BLOT 2.4).

Reatividade da Banda	RESULTADO
Nenhuma reatividade com proteínas específicas do HTLV (reativo apenas no controle de amostra).	Negativo para HTLV
Presença de p19 com (p26 ou p28 ou p32 ou p36 ou p53) porém ausência de p24, e ausência de GD21 ou rgp46-I ou rpg46-II ou gp46.	Negativo para HTLV
Quaisquer combinações de proteínas codificadas por GAG (p19, p26, p28, p32, p36, p53) com ausência de p24 e de quaisquer proteínas codificadas por ENV 9 rgp46-I ou rpg46-II ou gp46).	Negativo para HTLV
Qualquer proteína de GAG sozinha (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53).	Negativo para HTLV
Reatividade em p19 (com ou sem p24) + (GD21 e rgp46-I).	Soropositivo para HTLV -I
Reatividade em p24 (com ou sem p19) + (GD21 e rgp46-II).	Soropositivo para HTLV -II
Reatividade em (p19 + p24) + (GD21).	Soropositivo para HTLV
Detecção de bandas específicas para o HTLV, mas que não preenchem os critérios de soropositividade para HTLV-I, HTLV-II ou HTLV.	Indeterminado

O teste INNO-LIA é um imunoensaio de linha, ou um imunoblot usado para confirmação e discriminação de anticorpos contra o HTLV-1 ou 2 em soro ou plasma humano. O ensaio utiliza proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos que são purificados e fixados em uma membrana de nylon. Duas bandas *gag* (p19-I/II, p24I/II) e duas bandas *env* (gp46-I/II, gp21-I/II) são aplicadas para confirmar a presença de anticorpos contra o HTLV-1 ou 2. Os antígenos p19-I, gp46-I (específicos para HTLV-1) e o gp46-II (específicos para HTLV-2) permitem a diferenciação entre as infecções^(108,107).

Posteriormente são detectados com IgG de cabra anti-humana conjugada com fosfatase alcalina e revelada com o substrato BCIP/NBT (Quadro 2). Uma representação esquemática dos testes de WB e LIA podem ser observados na Figura 4.

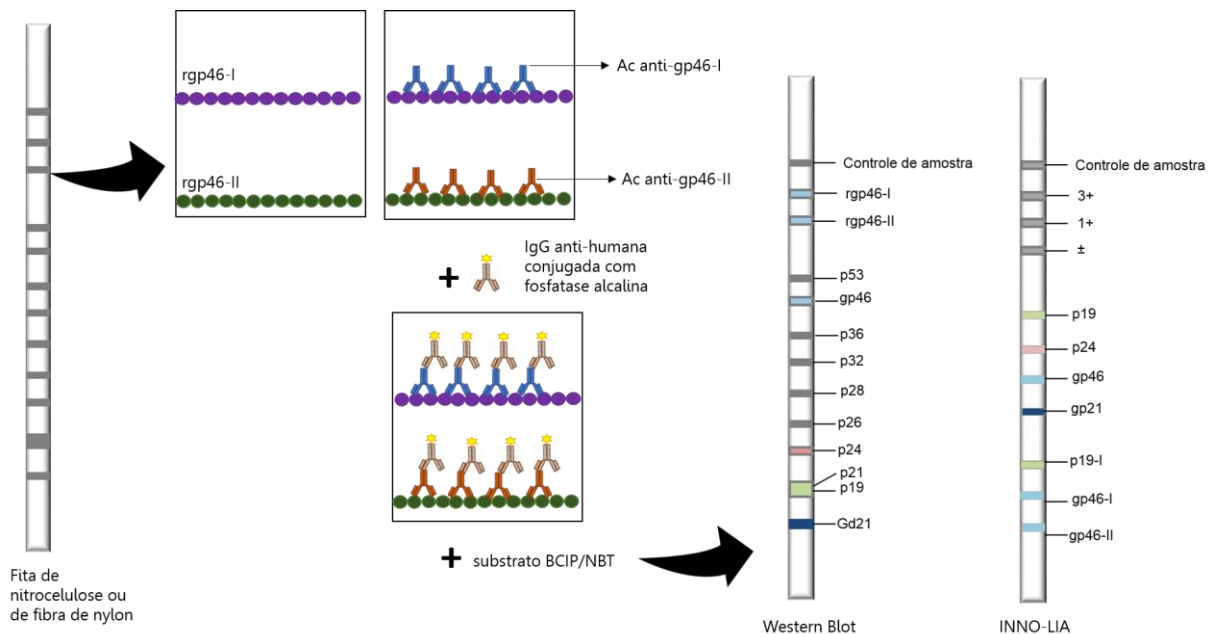


Figura 5 - Representação esquemática dos métodos WB e LIA e perfil de bandas apresentados nos ensaios de Western blot 2.4 e no INNO-LIA.

Fonte: O autor

É recomendado que, para confirmar a presença da infecção pelo HTLV, deve-se analisar inicialmente as bandas gag p19-I/II, gag p24-I/II, env gp46-I/II e env gp21-I/II. E seguir para etapa de discriminação do tipo do vírus se HTLV-1 ou HTLV-2 analisando as bandas env gp46-I, env gp46-II e gag p19-I, de acordo com critérios observados no Quadro 4.

Quadro 4 - Critérios de reatividade de bandas recomendados pelo fabricante para classificação do resultado no LIA (INNO-LIA)

Critérios para confirmação		
ANALISE DAS BANDAS	RESULTADO	RECOMENDAÇÃO
Nenhuma das 4 bandas	Negativo para anticorpos anti-HTLV	
Apenas UMA banda:		
Banda única ($\geq \pm$) p19-I/II	Negativo para anticorpos anti-HTLV	
Banda única ($\geq \pm$) p24-I/II	Negativo para anticorpos anti-HTLV	
Banda única ($\geq \pm$) gp46-I/II	Negativo para anticorpos anti-HTLV	
Banda única ($\geq \pm$) gp21-I/II	Indeterminado para anticorpos anti-HTLV	Investigação aprofundada
Doas bandas $\geq \pm$:		
gp21-I/II não reativo	Indeterminado para anticorpos anti-HTLV	Investigação aprofundada
gp21-I/II reativo	Positivo para anticorpos anti-HTLV	Etapa de discriminação
Três ou mais bandas $\geq \pm$	Positivo para anticorpos anti-HTLV	Etapa de discriminação

Critérios para discriminação		
Se (env gp46-I + gag gp19-I) > env gp46-II	Positivo para anticorpos anti-HTLV-1	
Se (env gp46-I + gag gp19-I) ≤ env gp46-II	Positivo para anticorpos anti-HTLV-2	
Se env gp46-II > env gp46-I	Positivo para anticorpos anti-HTLV-2	
Outras combinações	Positivo para anticorpos anti-HTLV (não tipado)	

Fonte: Bula do kit INNO-LIA

Da mesma forma como aconteceu com os ensaios ELISA, os testes de WB passaram por modificações com a adição de glicoproteínas recombinantes do envelope do HTLV-1 e HTLV-2 (rgp46-I e rgp46-II), uma proteína recombinante transmembrana comum aos HTLV (rgp21) e uma versão aprimorada da rgp21, denominada GD21, melhorando o desempenho do teste e possibilitando a diferenciação entre os dois tipos virais^(86,35,108,109). Mesmo após estas melhorias, o teste apresentou falha no diagnóstico sorológico de casos infectados pelo HTLV-2^(105,34) e taxas relevantes de soros com resultados indeterminados ou inconclusivos.

Trabalhos anteriores demonstraram que o número de resultados indeterminados no mundo tem ampla variação quando analisado pelo WB. Foi descrito índice de 14% na Europa⁽¹⁰⁵⁾, 50,5% França⁽³⁴⁾, 3,5% no Irã⁽³¹⁾, 50% na Suécia⁽⁸¹⁾, 76% em Camarões⁽¹¹⁰⁾ e 21% nos Estados Unidos^(111,112). No Brasil foram relatados índices de 61,8% em Fortaleza⁽¹¹³⁾, 16-83,5% em São Paulo^(114,106,109) e 8% em Belém^(38,115). A Tabela 1 mostra um resumo das taxas de sorodeterminação dos testes confirmatórios sorológicos WB e/ou LIA.

Tabela 1 - Taxas de resultados sorodeterminados em testes confirmatórios (WB e/ou LIA) no período de 1994 a 2018.

Autor/Ano	População	Método	Taxa de sorodeterminação
Ribeiro et al., 2018	Doadores de sangue. PI, Brasil	LIA	2,1% (1/47)
Stramer et al., 2018	Doadores de sangue, Maryland, EUA	WB	21% (21/100)
Umeki et al., 2018	População de área endêmica, Japão	LIA	1,4% (1/70)
Campos et al., 2017	Infectados com HIV, SP, Brasil	WB	16% (17/108)
		LIA	3% (3/108)
Treviño, et al., 2017	Infectados com HCV, Espanha	WB	36% (18/50)
Tosswill & Taylor, 2017	Indivíduos que foram encaminhados para sorologia, Inglaterra	WB	1% (8/864)
Cánepa et al., 2015	Indivíduos encaminhados por exposição a infecção, Argentina	WB	16,3% (48/294)
Grivas et al., 2014	Indivíduos em pesquisa sorológica, hospital, Austrália	WB	18,1% (62/343)
Blas et al., 2013	Mulheres da comunidade Shipibo-Konibo, Peru	WB	0,3% (4/ 1.253)

Tabela 1 - Taxas de resultados soroindevidados em testes confirmat6rios (WB e/ou LIA) no per6do de 1994 a 2018. (Continua76o)

Glasser et al., 2013	Sangue de cord6o e sangue perif6rico de gestantes, Tucson, EUA	WB	25% (6/24)
		LIA	76% (19/25)
Filippone et al., 2012	Habitantes de 6reas rurais, Camar6es	WB	65,6% (1.292/ 1968)
Vitone et al., 2006	Imigrantes da 6frica e doadores de sangue, It6lia	WB	27,2% (3/11)
Mangano et al., 2004	Doadores de sangue, Argentina	WB	61% (89/146)
Abbaszadegan et al., 2003	Doadores de sangue, Ir6	WB	3,5% (8/ 228)
Colin et al., 2003	Doadores de Sangue, AC, Brasil	WB	0,02% (2/11.121)
Le6n et al., 2003	Doadores de sangue, Caracas Venezuela	WB	4,1% (2/48)
Santos et al., 2003	Doadores de sangue, CE, Brasil	WB	61,7% (118/191)
Thorstensson et al., 2002	Doadores de sangue, Su6cia	WB	50% (146/289)
		LIA	5,9% (17/289)
Rouet et al., 2001	Doadores de sangue, Fran7a	WB	50,5% (150/297)
Sabino et al., 1999	Doadores de sangue, SP, Brasil	WB	60,9% (178/292)
		LIA	2% (6/292)
Arif & Ramia, 1998	Doadores de sangue, Ar6bia Saudita	WB	0,017% (6/ 34.541)
De-Ara6jo et al., 1998	Infectados com HIV, SP, Brasil	WB	27% (24/87)
Ishak et al., 1998	Doadores de sangue, PA, Brasil	WB	8,6% (3/35)
Vallinoto et al., 1998	Portadores HIV-I, PA, Brasil	WB	8,3% (1/12)
Zrein et al., 1998	Doadores de sangue, Europa	WB	52,7% (29/ 55)
		LIA	5,45% (3/55)
Dube et al., 1994	Adultos nativos do noroeste do Zaire	WB	15,3% (15/98)

A soroindevidaa76o pode estar relacionada a diversos fatores, como a baixa produ76o de anticorpos espec6ficos anti-HTLV, soroconvers6o, baixa carga proviral, variabilidade gen6tica do v6rus e do hospedeiro, rea76o cruzada com outras infec76es, ou fatores ligados ao teste diagn6stico, como o desempenho diagn6stico, execu76o do procedimento, inadequa76o do transporte ou armazenamento do kit, a caracter6stica do teste que mostra facilidade em detectar anticorpos contra produtos do gene *gag* e falha na detec76o de anticorpos contra os produtos do gene *env*. O estudo de Kuramitsu et al. (2017) sugere que amostras indevidadas no WB tendem a ter um n6vel extremamente baixo de express6o de ant6genos do HTLV-1, devido a caracter6sticas do genoma viral ⁽¹⁰⁰⁾.

Por estas raz6es, para que se obtenha um diagn6stico mais seguro, 6 necess6ria uma combina76o de teste agregado ao WB, o que contribui para o alto custo e para demora na conclus6o do diagn6stico ⁽¹¹⁶⁾. Assim, amostras indevidadas no WB devem ser analisadas por testes moleculares. Quando negativas no teste molecular, ter6o seu resultado definido como “amostra negativa para HTLV-1/2”. Caso a amostra seja indevidada no WB e positivas na PCR ter6 seu resultado definido como “amostra positiva para HTLV-1 e/ou HTLV-2”. No entanto, testes de detec76o molecular ainda n6o foram licenciados para fins comerciais ⁽¹¹⁷⁾.

O ensaio LIA mostrou melhor desempenho para o diagnóstico confirmatório de HTLV quando comparado ao WB 2.4^(109,118). Porém, devido a seu alto custo, ainda não foi empregado como rotina em todo o mundo e é escasso o número de estudos utilizando painel de soro representativo da população geral. Outros ensaios confirmatórios foram validados, mas entraram em desuso: a imunofluorescência indireta (IFI)⁽¹⁰⁴⁾ foi pouco utilizada por falta de kits disponíveis no mercado e por não discriminar o tipo viral; e a radio-imunoprecipitação (RIP) por conta da utilização de compostos radiativos. Assim, o WB tem sido usualmente empregado na rotina diagnóstica.

3.3.3 Diagnóstico molecular da infecção pelo HTLV

Os testes moleculares para diagnóstico do HTLV-1/2 empregam técnicas de amplificação do genoma viral por reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, *nested* (n-PCR) e em tempo real (qPCR). Tais metodologias baseiam-se na pesquisa de sequências genômicas provirais em células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) lisadas, buscado amplificar as regiões mais conservadas do genoma viral (*pol* ou *tax*) utilizando *primers* consenso^(119,124,40). Com isso, o diagnóstico da infecção pelo HTLV não depende da resposta imunológica e produção de anticorpos, mas sim da carga proviral.

Apesar da comprovada eficácia diagnóstica, os testes moleculares para detecção do HTLV ainda não foram estabelecidos como testes confirmatórios posteriores aos testes de triagem, apesar de muitos estudos sugerirem este algoritmo^(105,109,108,117,118,125,126). Para adoção deste algoritmo é necessário a padronização de protocolo, da região de detecção e disponibilidade de kits comerciais para detecção de DNA proviral com registro na ANVISA. Portanto tais testes são realizados de forma mais abrangente no âmbito da pesquisa.

3.4 Estudos de desempenho diagnóstico

Quando é desenvolvido um novo teste diagnóstico ou um teste antigo é aplicado para uma nova questão clínica, são necessárias avaliações cuidadosas sobre a concordância oferecida pelos resultados dos testes com o diagnóstico correto dos indivíduos investigados. Este processo é avaliado por estudos de acurácia diagnóstica. A análise de estudos de acurácia diagnóstica revelaram imperfeições graves, com importantes fontes de desvios e variações⁽¹²⁷⁾. Estas observações levaram ao desenvolvimento das ferramentas de avaliação da

qualidade de trabalhos publicados sobre validação de testes diagnósticos: como QUADAS (Avaliação de Qualidade para Estudos de Acurácia Diagnóstica - *Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies*)^(128,129), direcionado para qualificar estudos publicados, especialmente a partir de revisões sistemáticas; e o STARD (Padrões para Relatos de Acurácia Diagnóstica - *Standards for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy*) é um instrumento voltado para pesquisadores e editores, com o objetivo de avaliar a qualidade dos artigos por meio de checagem simples (*checklist*) de cada item e orienta autores na elaboração de relatos científicos de acurácia diagnóstica^(130,131).

O desenvolvimento de um teste diagnóstico é composto por quatro fases: fase I tem por objetivo verificar se dado teste é capaz de diferenciar os indivíduos portadores de determinado agravo daqueles que não o possuem, estabelecer parâmetros técnicos, algoritmos e critérios diagnósticos; na fase II os estudos exploram a acurácia diagnóstica, tendo como objetivo avaliar se determinado teste tem maior probabilidade em fornecer resultados positivos nos indivíduos portadores da doença que em não portadores, e vice-versa, quantificando o desempenho com amostras previamente classificadas através de testes de referência ou padrão-ouro, e são estudos retrospectivos, bem como o de fase I; fase III tem como objetivo determinar o desempenho do teste utilizando amostras de condição sorológica dos indivíduos desconhecida, trata-se de um estudo prospectivo e, muitas vezes, são realizados em ensaio randomizados; a fase IV tem por objetivo mensurar o impacto social e econômico da introdução de um teste, avaliando também possíveis problemas logísticos como armazenamento, congelamento de amostras ou calibração deficiente de equipamentos, que podem afetar a acurácia de um teste de diagnóstico após sua introdução na rotina^(132,133).

Estabelecer o diagnóstico é um processo imperfeito, que resulta em uma probabilidade. A acurácia diagnóstica de um teste revela o quanto dado teste é capaz de discriminar entre situações de saúde e doença ou estágios de uma determinada doença. Estudos de fase II, necessitam condições de análise controladas, com determinações precisas dos parâmetros de desempenho e utilização de amostras representativas da doença, independentemente da fase da doença ou origem dos participantes. Para avaliação quantitativa do desempenho de um dado teste é utilizada uma tabela de dupla entrada (tabela 2 x 2), relacionando os resultados obtidos através do teste índice (teste em análise), com os resultados obtidos através do padrão-ouro anteriormente definido, e esta capacidade discriminatória pode ser quantificada usando indicadores de desempenho como sensibilidade (Sen), especificidade (Esp), acurácia (Acu),

ou razão de verossimilhança (RV), área sob a curva (AUC) e *odds ratio* diagnóstica (ORD). E para avaliação qualitativa do desempenho pode ser realizado uma análise de concordância entre testes, calculada através do índice de Kappa de Cohen (κ)⁽¹³⁴⁻¹³⁷⁾.

No diagnóstico sorológico, os parâmetros a serem determinados são aqueles relacionados ao sucesso do teste em identificar corretamente a doença em indivíduos que realmente o possuem, independentemente da presença ou ausência de sinais e sintomas. Quando um teste apresenta indicadores insatisfatórios, seja pela população alvo ou por características do próprio teste, elevam os números de resultados indesejados (como falso-positivos e falso-negativos), gerando importante impacto orçamentário para o serviço público de saúde⁽¹³⁶⁾.

3.4.1 Sensibilidade e Especificidade

A sensibilidade de um teste é a proporção de verdadeiros positivos que são corretamente identificados⁽¹³⁸⁾. Esta estima a probabilidade de obter um resultado positivo em indivíduos com a doença, e calculada por:

$$\text{Sen} = \frac{\text{Verdadeiro positivo}}{\text{Verdadeiro positivo} + \text{Falso negativo}}$$

A especificidade de um teste é a proporção de verdadeiros negativos que são corretamente identificados⁽¹³⁸⁾. Esta estima a probabilidade de obter um resultado negativo em um sujeito sem doença, calculada por:

$$\text{Esp} = \frac{\text{Verdadeiro negativo}}{\text{Verdadeiro negativo} + \text{Falso positivo}}$$

Tanto a sensibilidade quanto a especificidade não sofrem influência da prevalência da doença, mas podem depender do espectro da doença no grupo estudado⁽¹³⁹⁾. A sensibilidade e a especificidade são proporções, portanto, intervalos de confiança podem ser calculados usando métodos padrão⁽¹³⁶⁾.

3.4.2 Razão de verossimilhança positiva e negativa (RV+ e RV-)

Razão de verossimilhança é a probabilidade de que um determinado resultado de teste (positivo ou negativo) seja esperado em um indivíduo com a doença, em comparação com a probabilidade do mesmo resultado ser esperado em um indivíduo sem a doença ⁽¹³⁷⁾. Este parâmetro é útil na descrição do poder discriminatório de um teste e define a possibilidade de um resultado particular entre indivíduos infectados sobre a probabilidade desse mesmo resultado específico entre indivíduos não infectados. A RV+ nos informa quantas vezes mais provável que um resultado de teste positivo ocorra em indivíduos com a doença do que naqueles sem a doença. Quanto maior, mais forte será a evidência da presença da doença. A RV- representa a razão entre a probabilidade de ocorrer um resultado negativo em indivíduos com a doença e a probabilidade de que o mesmo resultado ocorra em indivíduos sem a doença. Para testes com resultados dicotômicos é calculado de acordo com as seguintes fórmulas ⁽¹⁴⁰⁾:

$$RV+ = \frac{\text{Sensibilidade}}{1 - \text{Especificidade}} \qquad RV- = \frac{1 - \text{Sensibilidade}}{\text{Especificidade}}$$

Existe um consenso de que RV positivos acima de 10 e RV negativos abaixo de 0,1 têm contribuição substancial para o diagnóstico ⁽¹⁴¹⁾. Quanto mais alto o RV positivo mais indicativo é o teste para detecção da infecção. Por outro lado, quanto menor o RV negativo mais significativo é o teste na exclusão da infecção. Estas medidas de precisão diagnóstica não são sensíveis a prevalência da infecção ⁽¹⁴²⁾.

3.4.3 Área abaixo da curva ou *area under the curve* (AUC)

Medidas de diagnóstico dependem do ponto de corte utilizado. Existe uma combinação de valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica para cada corte, que definem a curva ROC (*receiver operating characteristic*). A forma desta curva e a AUC podem ajudar a estimar o poder discriminatório de um teste. Quanto mais próxima a curva estiver localizada do canto superior esquerdo e quanto maior a área abaixo da curva melhor será o teste para diferenciar entre doente e não doente ^(136,143).

Diferente da sensibilidade e especificidade, a AUC é uma medida global da acurácia diagnóstica e não traz informações sobre parâmetros individuais. Uma AUC mais alta indica maior especificidade e sensibilidade em todos os pontos de corte disponíveis. Medidas globais existem para avaliação geral e para comparação de dois ou mais testes diagnósticos. A AUC pode ter qualquer valor entre 0 e 1, quando AUC=0,5 a curva ROC corresponde a chance aleatória e quando AUC=1,0 o teste apresenta acurácia perfeita⁽¹⁴²⁾.

3.4.4 Acurácia diagnóstica global

É outra medida global que expressa como uma proporção de indivíduos classificados corretamente entre todos os indivíduos analisados. Esta medida diagnóstica é afetada pela prevalência da doença. Portanto a acurácia diagnóstica de um determinado teste aumenta à medida que a prevalência da doença diminui⁽¹³⁹⁾.

3.4.5 Odds ratio diagnóstico (ORD)

O ORD é considerado um parâmetro de desempenho global que resume o desempenho diagnóstico de um teste. É um número único que descreve a probabilidade de obter um resultado positivo em uma pessoa com a doença do que em alguém sem a doença, calculado pela razão entre RV+/RV-. O ORD não depende da prevalência da doença, no entanto, depende significativamente da sensibilidade e especificidade do teste analisado^(134,140).

3.4.6 Índice de Kappa de Cohen (κ)

Para uma avaliação qualitativa do desempenho de um teste diagnóstico pode ser realizada uma análise de concordância entre testes através do índice Kappa de Cohen. Esta é uma medida de concordância que indica a proporção de concordância além do esperado pelo acaso. Os valores variam de 0 a 1, sendo que “0” representa não haver concordância além do puro acaso, e “1” representa a concordância perfeita⁽¹⁴³⁾. O κ é calculado pela seguinte fórmula:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Po}$$

Onde P_o é a probabilidade observacional de concordância, e P_e é a probabilidade hipotética de concordância, ou seja, proporção de concordâncias esperadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de acurácia diagnóstica de fase II, realizado no período de fevereiro de 2015 a dezembro de 2017, utilizando amostras de plasma anonimizadas obtidas do biorepositório do Centro Integrado e Multidisciplinar de Atendimento ao Portador de HTLV (CHTLV) da EBMSP. O CHTLV é um ambulatório aberto ao público que oferece atendimento e serviços interdisciplinares, incluindo tratamento médico, diagnóstico laboratorial, aconselhamento psicológico e fisioterapia.

4.2 Montagem do Painel

Todas as amostras incluídas no estudo foram previamente avaliadas quanto a anticorpos anti-HTLV-1/2 utilizando um ensaio imunoenzimático (Sistemas de teste Ortho[®] HTLV-1 / HTLV-2 Ab-Capture ELISA, Diagnóstico Ortoci-clínico, Raritan, EUA), seguido por Western Blot para confirmação diagnóstica (HTLV Blot 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapura - mais recentemente MP Biomedicals, Asia Pacific Pte. Ltd). Os resultados foram interpretados de acordo com os critérios indicados pelo fabricante e de acordo com a diretriz do Ministério da Saúde do Brasil⁽²³⁾. O painel foi originalmente composto por 416 amostras, 200 foram consideradas HTLV-negativas, 170 foram determinadas como positivas para HTLV (122 HTLV-1, 31 HTLV-2, 5 HTLV-1 + HTLV-2 e 12 HTLV) e 46 foram indeterminados pelo Western Blot. As amostras indeterminadas foram excluídas, formando um painel de estudo final composto por 370 amostras.

4.3 Análise de desempenho dos testes de triagem sorológica

Quatro testes comerciais de triagem sorológica disponíveis para o diagnóstico do HTLV-1/2 no Brasil foram incluídos neste estudo. Foram selecionados três testes comerciais de ELISA específicos para HTLV-1/2, de 3^a geração (Gold ELISA HTLV-1/2 – REM Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil; Murex HTLV-1/2 – DiaSorin SpA, Dartford, Reino Unido; e Anti-HTLV-1/2 SYM Solution – Symbiosis Diagnostica LTDA, Leme, Brasil) e um teste comercial de CLIA (Architect rHTLV-1/2 – Divisão de Diagnósticos da Abbott,

Wiesbaden, Alemanha) (Figura 5). Todos os testes comerciais foram realizados seguindo estritamente as especificações dos fabricantes.

Os valores dos pontos de corte (*cut-off*), bem como a zona cinza, foram calculados para cada teste seguindo recomendações dos fabricantes, a saber: adição de 0,2 à média das réplicas do controle negativo para o Murex; adição de 0,18 à média dos controles negativos em replicata para o SYM Solution; e adicionando 0,25 à média do controle negativo para o Gold ELISA.

No CLIA foram utilizadas 217 amostras do painel (105 não reagente e 112 reagentes para HTLV-1/2) e o valor do *cut-off* foi calculado utilizando a média dos calibradores negativos + 0,15 x média dos calibradores positivos, de acordo com orientação do fabricante. De modo a normalizar os dados, todos os resultados foram expressos através da representação gráfica dos valores num formato de índice que representa a razão entre a densidade óptica (DO) da amostra e a DO do *cut-off* de cada ensaio. Este índice é referido como índice de reatividade (IR) e os resultados <1,00 foram considerados negativos. Se o valor de IR de uma amostra fosse de $1,0 \pm 10\%$, o resultado foi considerado indeterminado (ou na zona cinza); estas amostras foram consideradas inconclusivas.

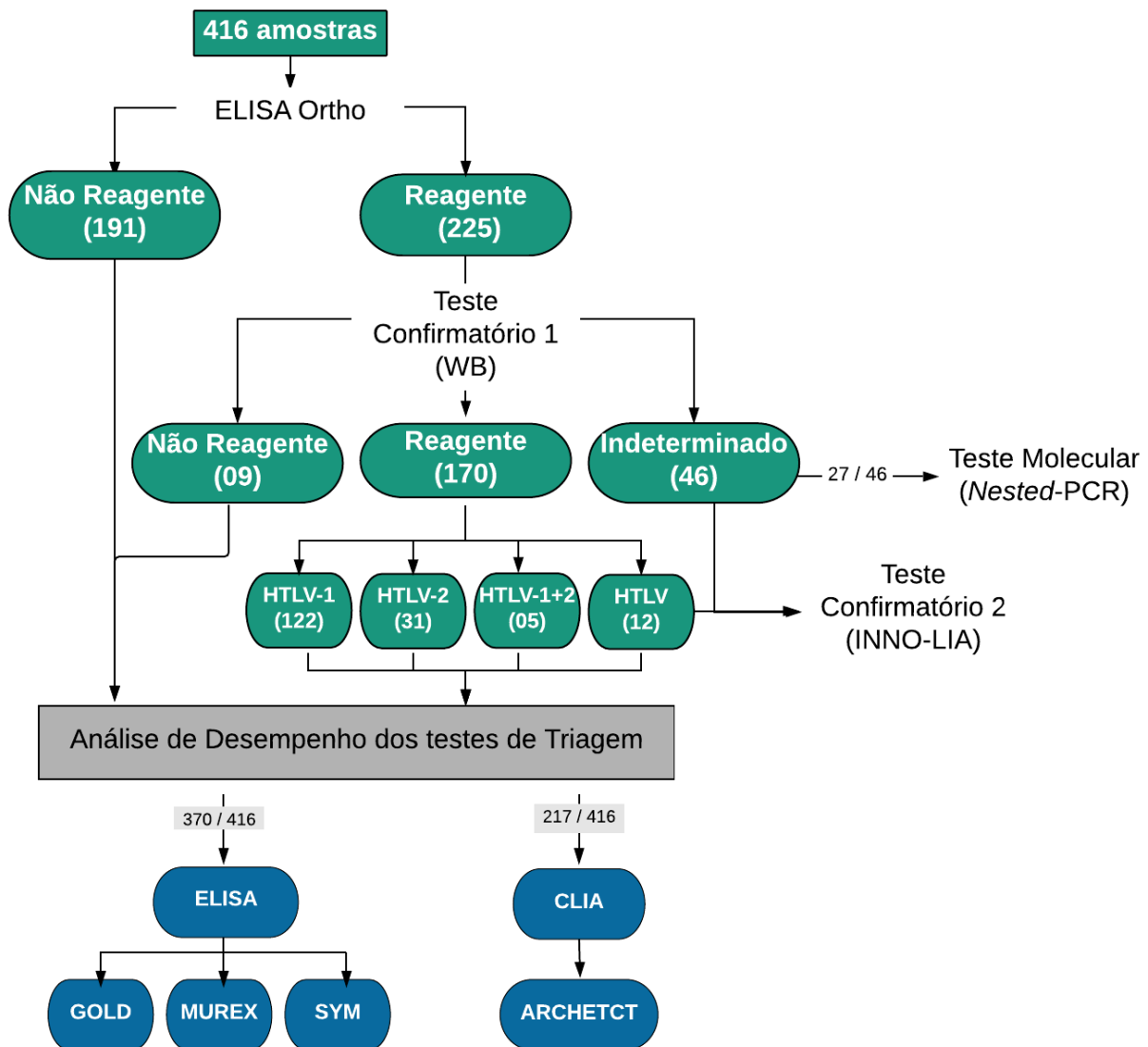


Figura 6 - Fluxograma que descreve o desenho do estudo de análise de desempenho dos testes de triagem sorológica para HTLV-1/2

Fonte: A autora

4.4 Detecção molecular

PBMC de 27 participantes com resultados indeterminados de WB foram obtidas de amostras de sangue com EDTA utilizando centrifugação em gradiente de densidade e o DNA foi extraído utilizando kit de *spin column* (Qiagen, Hilden, Alemanha). As amostras de DNA foram submetidas a *nested-PCR* utilizando os *primers* da região 5' de repetição terminal longa (LTR) do HTLV-1⁽¹⁴⁴⁾, e *primers* externos BSQF6/BSDR3 e *primers* internos BSQF2/BSDR4, para amplificar um fragmento de 672 pb da região LTR do HTLV-2⁽¹⁴⁵⁾. Todos os produtos amplificados foram submetidos a um ensaio de eletroforese utilizando um gel de agarose a 1% com DNA Sybr Safe (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido).

4.5 Análise do teste confirmatório INNO-LIA

As 46 amostras que apresentaram resultado indeterminado e as 12 amostras com resultado positivo para HTLV, sem discriminação do tipo viral no WB, foram submetidas ao teste confirmatório INNO-LIA[®] HTLV-I/II (Fujirebio Diagnostics Inc, Malvern, PA, EUA) (Figura 5). Os resultados deste ensaio foram determinados seguindo os critérios de validação e critérios de análise da intensidade da reação nas linhas do antígeno para confirmação e/ou discriminação da infecção, seguindo as especificações do fabricante (Quadro 4).

4.6 Considerações éticas

Este estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) de Pesquisa Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública / Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências - EBMSP / FBDC (464.286) (ANEXO A), seguindo os princípios expressos na Declaração de Helsinque. As amostras foram obtidas dos bancos de amostras do Centro Integrativo e Multidisciplinar de Atendimento ao Portador de HTLV (CHTLV) da EBMSP / FBDC. Para proteger a identidade de cada participante foi determinado que todas as amostras fossem anonimizadas para que os pesquisadores não tivessem acesso aos dados privados dos participantes do estudo, evitando assim a necessidade de consentimento verbal ou escrito.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram codificados e analisados utilizando *software* Prism versão 7 (GraphPad, San Diego, EUA). As estatísticas descritivas foram apresentadas como médias geométricas \pm desvio padrão. Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste t de Student. Quando a homogeneidade não foi confirmada, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Todas as análises foram bicaudais e valores de p abaixo de 5% foram considerados significativos ($p < 0,05$). O desempenho dos testes foi calculado utilizando uma abordagem dicotômica e comparado em termos de sensibilidade, especificidade, acurácia, razão de verossimilhança (RV) e *odds ratio* diagnóstica (ORD). Além disso, também construímos a curva ROC (*receiver characteristic*) e a respectiva área abaixo da curva que serve como uma medida global do desempenho do teste. Intervalos de confiança (IC) foram empregados em um nível de confiança de 95%.

A força da concordância entre os testes de ELISA e os resultados da PCR e a força de concordância entre o WB 2.4 e o INNO-LIA foram avaliadas pelo coeficiente de Kappa de Cohen (κ) que verifica se a concordância ocorreu ao acaso. Seus valores são interpretados como ruim ($\kappa \leq 0$), leve ($0 < \kappa \leq 0.20$), razoável ($0.21 < \kappa \leq 0.40$), moderado ($0.41 < \kappa \leq 0.60$), substancial ($0.61 < \kappa \leq 0.80$) e perfeito ($0.81 < \kappa \leq 1.0$)⁽¹⁴³⁾.

6 RESULTADOS

6.1 Desempenho dos testes de triagem sorológica com WB 2.4 como padrão ouro

Estão descritos nas tabelas 2 e 3 os resultados sorológicos obtidos pelos testes de ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution) e pelo teste de CLIA (Architect *r*HTLV-1/2), respectivamente, frente ao painel de amostras.

Tabela 2 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes de triagem comercial por ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution).

WB 2.4	Gold ELISA		Murex		SYM Solution	
	Positivo nº	Negativo nº	Positivo nº	Negativo nº	Positivo nº	Negativo nº
Positivo (<i>n</i> =170)	170	0	170	0	170	0
HTLV-1 (<i>n</i> =122)	122	0	122	0	122	0
HTLV-2 (<i>n</i> =31)	31	0	31	0	31	0
HTLV-1e2 (<i>n</i> =5)	5	0	5	0	5	0
HTLV (<i>n</i> =12)	12	0	12	0	12	0
Negativo (<i>n</i> =200)	1	199	16	184	2	198
Total (<i>n</i> =370)	171	199	186	184	172	198

Tabela 3 - Tabulação cruzada dos resultados do teste de triagem por CLIA (Architect *r*HTLV-1/2).

WB 2.4	Architect <i>r</i> HTLV-1/2	
	Positivo nº	Negativo nº
Positivo (<i>n</i> =112)	112	0
HTLV-1 (<i>n</i> =85)	85	0
HTLV-2 (<i>n</i> =15)	15	0
HTLV-1e2 (<i>n</i> =5)	5	0
HTLV (<i>n</i> =7)	7	0
Negativo (<i>n</i> =105)	2	103
Total (<i>n</i> =217)	114	103

O desempenho dos testes de ELISA e CLIA foram avaliados observando a distribuição do índice de reatividade (IR) dos testes, como mostrado na Figura 6. Todos os testes de triagem mostraram 100% de sensibilidade. Os valores da área abaixo da curva (AUC) foram >0,99, demonstrando excelente acurácia diagnóstica geral para todos os testes avaliados (Figura 6). Os valores de IR

para as amostras positivas foram variáveis, de 14,2 para SYM Solution e 14,5 para Gold ELISA e 16,8 no Murex. Além disso, o Architect r-HTLV-1/2 produziu um valor de IR > 90.

Em relação as 200 amostras negativas para HTLV-1/2, o kit Gold apresentou reatividade em uma amostra, o kit Murex em 16 amostras e o kit SYM Solution em duas amostras (Tabela 02). Das 105 amostras negativas avaliadas pelo CLIA, duas apresentaram reatividade. Assim, os testes SYM Solution e Gold ELISA apresentaram valores de especificidade >99%, o teste Architect r-HTLV-1/2 produziu uma especificidade de 98,1%, seguido pelo teste Murex com 92,0%. (Figura 6). As diferenças em especificidade e IR não foram estatisticamente significativas para os valores obtidos para os testes SYM Solution e Gold ELISA. O valor máximo do IR foi obtido com o Murex (IR = 0,30) em comparação com outros testes ELISA (Figura 6).

Considerando os valores de IR de $1,0 \pm 0,10$ como inconclusivos, isto é, na zona cinza, verificou-se que todas as amostras positivas para HTLV-1/2 apresentaram resultados conclusivos quando analisadas usando qualquer um dos quatro kits de triagem analisados. Com relação às amostras negativas, apenas uma caiu na zona cinza quando analisada com o teste Gold ELISA. Com relação à acurácia diagnóstica, os testes Gold e SYM Solution demonstraram a maior acurácia (> 99,5%), enquanto o Murex apresentou um resultado mais baixo (95,6%). O Architect rHTLV-1/2 mostrou 99,1% de acurácia.

A análise do *odds ratio* de diagnóstico (ORD), com base nas razões de verossimilhança, revelam um valor de 524.000 para o Architect rHTLV-1/2, 338.200 para o Gold, 168.254 para o SYM Solution e 19.552 para o Murex. Entre os testes de ELISA, o kit Gold apresentou o melhor desempenho global, como observado pelos parâmetros de análise ROC e especialmente em relação ao ORD extremamente alto mostrado por este teste (Figura 6).

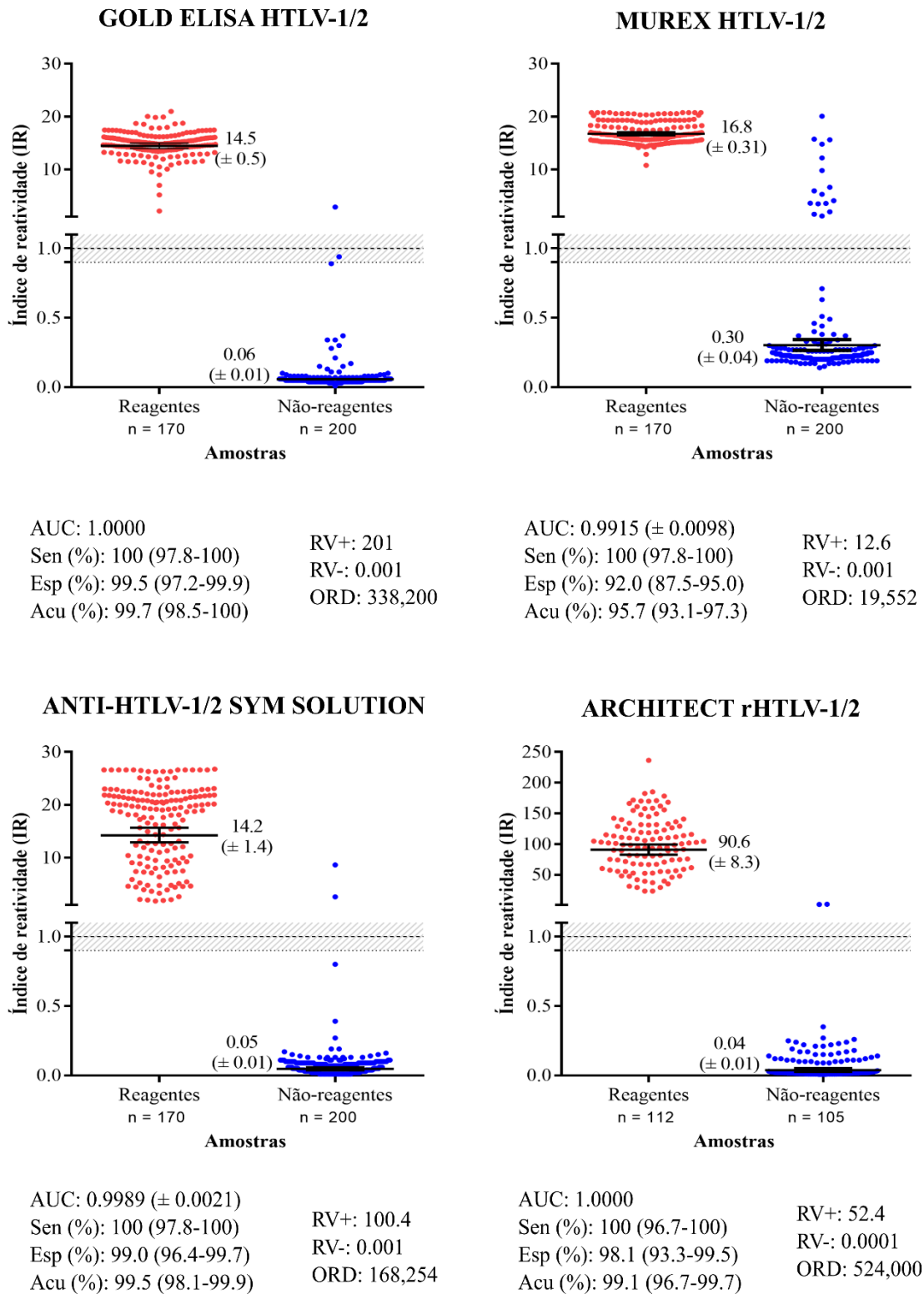


Figura 7 - Índice de reatividade (IR) obtido com amostras de soro reativo (em vermelho) e não-reactivo (em azul) para HTLV-1/2.

O ponto de corte foi IR = 1,0 e a área delimitada pelas linhas representa a zona cinza (IR ± 10%). Os números para cada grupo representam as médias geométricas (± 95% IC); AUC (área sob curva); Sen (Sensibilidade); Esp (especificidade); Acu (acurácia); RV (razão de verossimilhança); ORD (*odds ratio* diagnóstico).

Estratificando as amostras positivas para HTLV-1/2 de acordo com o tipo viral, observamos que entre os ensaios de ELISA, os maiores valores de IR foram encontrados no teste Murex. Em uma avaliação da sobreposição dos IR (95%IC) das amostras positivas, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Índice de reatividade das amostras positivas para HTLV-1/2 de acordo com o tipo viral nos testes de triagem sorológica.

ELISA	IR (95% IC)			
	HTLV-1 (n = 122)	HTLV-2 (n = 31)	HTLV-1+2 (n = 5)	HTLV (n=12)
GOLD ELISA	14,9 (14,4–15,4)	13,8 (13,3–14,4)	14,1 (13,3–15,0)	11,7 (7,9–17,2)
MUREX HTLV-1/2	16,4 (16,0–16,7)	18,2 (17,5–18,9)	18,4 (16,8–20,2)	16,4 (14,8–18,3)
SYM SOLUTION	14,8 (13,2–16,7)	15,9 (13,9–18,2)	11,8 (7,60–18,4)	6,90 (4,10–11,6)
CLIA	HTLV-1 (n = 85)	HTLV-2 (n = 15)	HTLV-1+2 (n = 5)	HTLV (n= 7)
ARCHITECT rHTLV-1/2	95,8 (85,8 – 107,1)	70,6 (59,9–83,1)	111,4 (76,1–163,1)	67,1 (49,7–90,6)

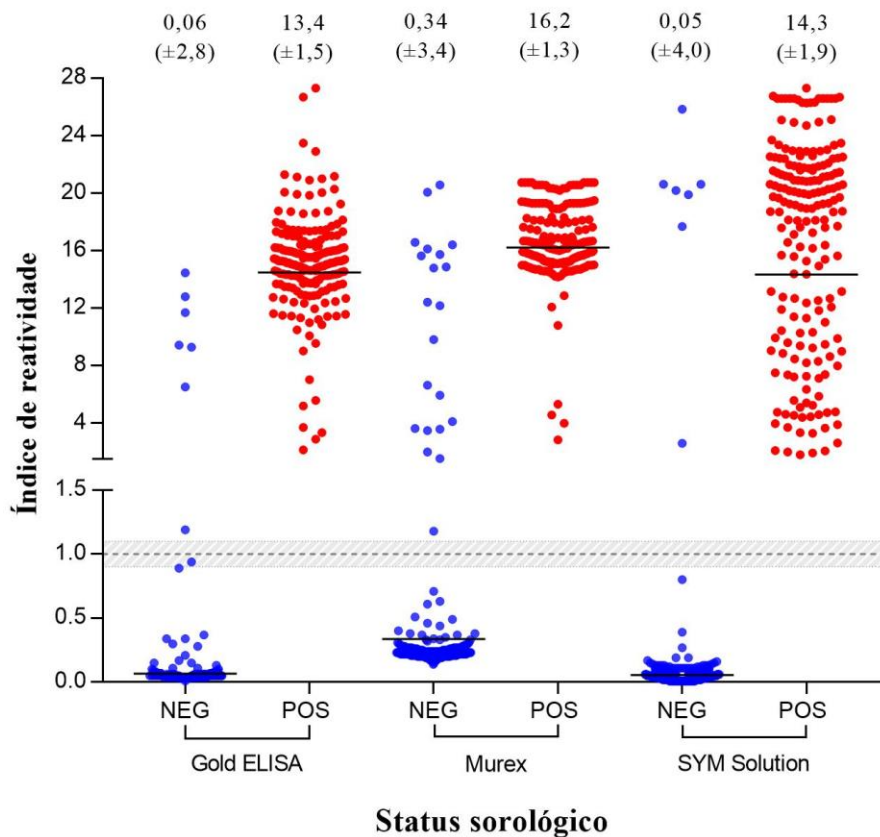
6.2 Desempenho dos ELISA com PCR

Das 46 amostras indeterminadas, 27 com resultado do PCR, foram analisadas para avaliar a acurácia diagnóstica dos três ELISAs comerciais. Considerando o PCR como padrão ouro para o diagnóstico de HTLV, 8 amostras foram negativas (29,6%) e 19 positivas (70,4%) para HTLV-1. Adicionando esses resultados, compomos um painel com 189 amostras positivas e 208 amostras negativas, e o desempenho dos testes de ELISA foram avaliados observando a distribuição do índice de reatividade (IR) dos testes, como mostrado na Figura 7, e seus respectivos resultados na Tabela 5.

As 189 amostras foram classificadas como positivas pelos três testes de ELISA, portanto todos testes apresentaram 100% de sensibilidade. Os valores da área abaixo da curva (AUC) foram >97%. Em relação às 208 amostras negativas, os testes Gold e SYM Solution apresentaram reatividade em 7 amostras, e o teste Murex em 21 amostras. Assim, os testes SYM Solution e Gold ELISA apresentaram valores de especificidade 96%, o teste Murex produziu uma especificidade de 89,9% (Figura 7).

Tabela 5 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes de triagem comercial por ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution) com o painel de 397 amostras.

WB/PCR	Gold ELISA		Murex		SYM Solution	
	Positivo n°	Negativo n°	Positivo n°	Negativo n°	Positivo n°	Negativo n°
Positivo ($n=189$)	189	0	189	0	189	0
Negativo ($n=208$)	7	201	21	187	7	201
Total ($n=397$)	196	201	210	187	196	201



	Sen (%)	Esp (%)	Acu (%)	RV+	RV-	ORD	AUC
Gold ELISA	100 (98,0-100)	96,6 (93,2-98,4)	98,2 (96,4-99,1)	29,71	0,001	29.710	0,9964
Murex	100 (98,0-100)	89,9 (85,0-93,3)	94,7 (92,5-96,5)	9,905	0,001	9.905	0,9780
SYM Solution	100 (98,0-100)	96,6 (93,2-98,4)	98,2 (96,4-99,1)	29,71	0,001	29.710	0,9822

Figura 8 - Índice de reatividade (IR) obtido com amostras de soro reativo (em vermelho) e não-reativo (em azul) para HTLV-1/2.

O ponto de corte foi IR = 1,0 e a área delimitada pelas linhas representa a zona cinza (IR ± 10%). Os números para cada grupo representam as médias geométricas (± 95% IC); AUC (área sob curva); Sen (Sensibilidade); Esp (especificidade); Acu (acurácia); RV (razão de verossimilhança); ORD (*odds ratio* diagnóstico) com o painel de 397 amostras.

Ao analisarmos isoladamente o desempenho dos testes de ELISA frente as 27 amostras com resultado da PCR, de origem indeterminada no WB (Tabela 6), identificamos que todos testes permanecem com 100% de sensibilidade. Por outro lado, todos os testes apresentaram especificidade menor que 25%, com ELISA Gold apresentando especificidade de 12,5%. Apesar da baixa acurácia, o teste Murex e SYM Solution apresentaram a maior acurácia em comparação ao Gold ELISA. Houve uma concordância leve e razoável entre a PCR e os testes de ELISA (Kappa de Cohen <0,40) para o diagnóstico de infecção por HTLV (Figura 8).

Tabela 6 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes de triagem comercial por ELISA (Gold ELISA, Murex e SYM Solution) e o PCR das amostras com resultado indeterminado no WB.

PCR	Gold ELISA		Murex		SYM Solution	
	Positivo n°	Negativo n°	Positivo n°	Negativo n°	Positivo n°	Negativo n°
Positivo (<i>n</i> =19)	19	0	19	0	19	0
Negativo (<i>n</i> =8)	7	1	6	2	6	2
Total (<i>n</i> =27)	26	1	25	2	25	2

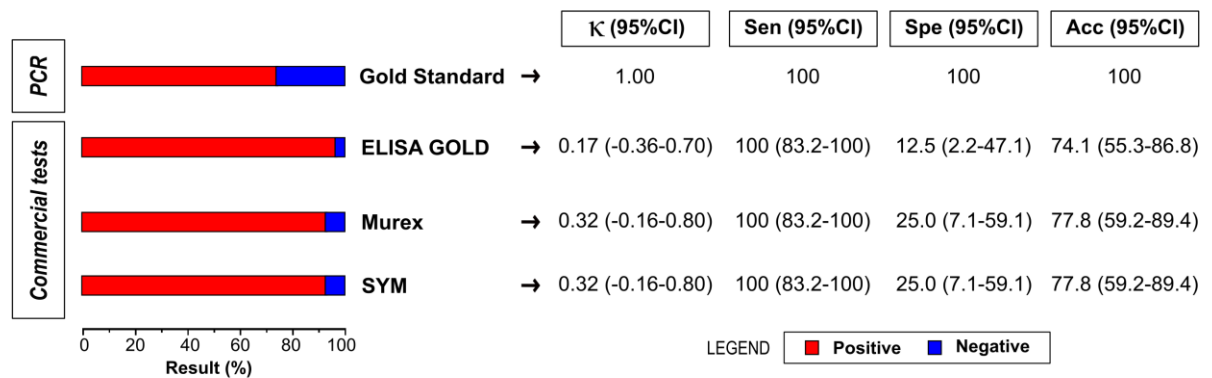


Figura 9 - Análise de amostras indeterminadas em WB usando PCR como padrão ouro.

Acu (acurácia); IC (intervalo de confiança); κ (coeficiente Kappa de Cohen); PCR (reação em cadeia da polimerase); Sen (sensibilidade); Spe (especificidade).

6.3 Análise dos resultados indeterminados

Adicionalmente as amostras com resultado indeterminado no WB foram testadas nos ensaios de triagem Gold ELISA, Murex, SYM Solution e Architect rHTLV-1/2 (46 ELISA e 22 CLIA) e os IR estão representados na Figura 9.

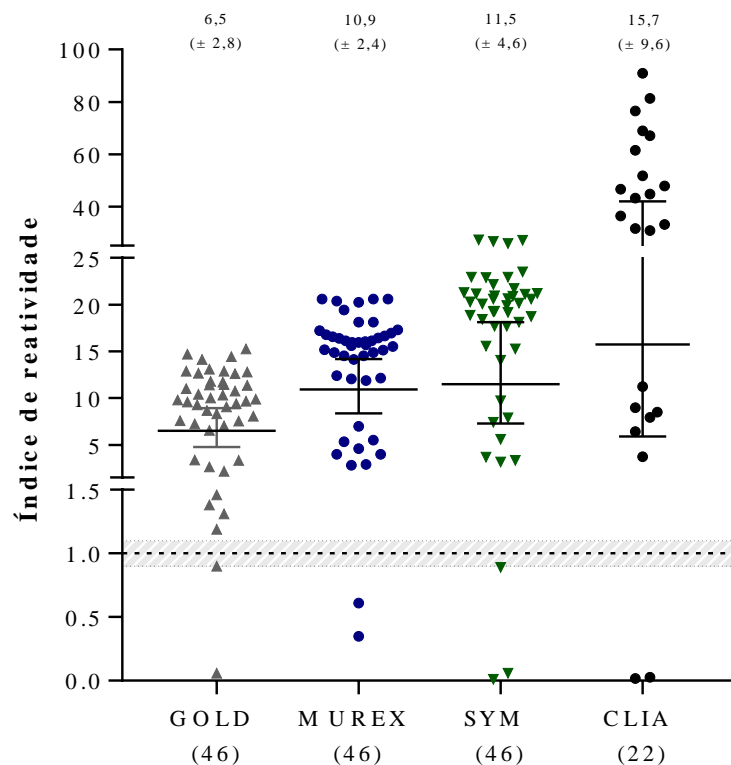


Figura 10 - Índice de reatividade (IR) obtido com amostras de resultado indeterminado no WB para HTLV-1/2 utilizando testes Gold ELISA (em cinza), Murex (em azul), SYM Solution (em verde) e Architect rHTLV-1/2 (em preto).

O valor de corte foi IR = 1,0 e a área delimitada por linhas representa a zona cinza (IR ± 10%). Os números para cada grupo representam as médias geométricas (± IC 95%).

6.4 Teste Confirmatório INNO-LIA x WB

De todas as amostras que fizeram parte do estudo, 1,7% (7/416) apresentaram resultado indeterminado considerando o INNO-LIA como teste confirmatório. O teste INNO-LIA classificou 85% das amostras com resultado indeterminado no WB como reagentes para infecção pelo HTLV (5 HTLV-1; 03 HTLV-2 e 31 HTLV) com uma correlação de $\kappa = 0,15$, que representa concordância leve entre os dois testes confirmatórios sorológicos (Tabela 7).

Tabela 7 - Tabulação cruzada dos resultados dos testes sorológicos confirmatórios WB 2.4 e INNO-LIA de 58 amostras.

WB 2.4	INNO-LIA (n=58)					Total	κ
	Negativo	HTLV-1	HTLV-2	HTLV	Indeterminado		
Indeterminado	-	17(37%)	03 (6%)	19 (42%)	07 (15%)	46	0,15
HTLV	-	06(50%)	-	06 (50%)	-	12	0,50

κ = Kappa de Cohen

O padrão de reatividade de bandas dessas amostras pelo WB 2.4 e pelo INNO-LIA estão representados respectivamente nas tabelas 8 e 9, mostrando no WB uma frequência maior para o padrão de reatividade apenas para a proteína GD21, seguido pelo padrão de GD21+p19, não sendo suficiente para confirmação da infecção. No INNO-LIA a reatividade da banda gp46 foi importante para a classificação dos resultados das amostras inicialmente indeterminadas pelo WB.

Tabela 8 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica das amostras com resultado indeterminado no WB2.4.

Resultado WB 2.4	Gag		Env				Qualquer combinação de p26, p28, p32, p36, p53	N amostras com este perfil de bandas
	p19	p24	GD21	gp46	rgp46-I	rgp46-II		
Indeter.	-	-	+	-	-	-	-	14
Indeter.	+	-	+	-	-	-	-	10
Indeter.	+	-	+	-	-	-	+	6
Indeter.	-	-	+	-	+	-	-	6
Indeter.	+	+	-	+	-	-	+	2
Indeter.	-	+	+	-	-	-	-	2
Indeter.	+	-	+	+	-	-	+	1
Indeter.	+	+	-	-	-	+	-	1
Indeter.	+	-	+	-	-	-	-	1
Indeter.	-	-	-	-	-	+	-	1
Indeter.	-	-	+	-	-	+	-	1
Indeter.	-	-	+	-	+	+	-	1

Tabela 9 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica das amostras com resultado positivos para HTLV sem discriminação do tipo no WB.4.

Resultado WB 2.4	Gag		Env				Qualquer combinação de p26, p28, p32, p36, p53	N amostras com este perfil de bandas
	p19	p24	GD21	gp46	rgp46-I	rgp46-II		
HTLV	+	+	+	+	-	-	+	8
HTLV	+	+	+	-	-	-	+	2
HTLV	+	+	+	+	-	-	+	1
HTLV	+	+	+	-	-	-	-	1

Das 12 amostras que apresentaram resultado positivo para HTLV, sem discriminação do tipo viral no WB 2.4, 6 amostras (50%) foram classificadas como reagentes para o vírus do tipo 1 pelo INNO-LIA, com uma correlação de $\kappa = 0,5$, representando uma concordância moderada entre os dois testes confirmatórios sorológicos (Tabela 7). O padrão de reatividade de bandas dessas amostras pelo WB 2.4 e pelo INNO-LIA estão representados respectivamente nas tabelas 10 e 11. Adicionalmente foram testadas 16 amostras negativas no WB. Destas, nenhuma apresentou reatividade no INNO-LIA e 6 amostras positivas para HTLV-1 ou 2 foram classificadas pelo INNO-LIA como no WB.

Tabela 10 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica no teste INNO-LIA das amostras com resultado indeterminado no WB2.4.

Resultado INNO-LIA	Gag			Env				N amostras com este perfil de bandas
	p19	p24	p19-I	GD21	gp46	rgp46-I	rgp46-II	
HTLV-1	+	-	+	+	+	+	-	3
HTLV-1	+	+	+	+	+	+	-	2
HTLV-2	+	-	-	+	+	-	+	1
HTLV-2	+	+	-	+	+	-	+	1
HTLV-2	-	+	-	+	+	-	+	1
HTLV	-	-	-	+	+	+	-	5
HTLV	+	-	-	+	+	+	-	7
HTLV	+	-	-	+	-	-	-	7
HTLV	+	-	-	+	+	-	-	6
HTLV	-	-	-	+	+	-	-	2
HTLV	+	-	+	+	+	-	-	2
HTLV	+	+	-	+	-	-	-	1
HTLV	+	-	+	+	-	-	-	1
Indeter.	-	-	-	+	-	-	-	7

Tabela 11 - Frequência dos padrões de reatividade antigênica no teste INNO-LIA das amostras com resultado positivos para HTLV sem discriminação do tipo no WB2.4.

Resultado INNO-LIA	Gag			Env				N amostras com este perfil de bandas
	p19	p24	p19-I	GD21	gp46	rgp46-I	rgp46-II	
HTLV-1	+	+	+	+	+	+	+ *	1
HTLV-1	+	+	+	+	+	+	-	1
HTLV-1	+	+	±	+	+	+	-	1
HTLV-1	+	+	+	+	+	±	-	3
HTLV	+	+	-	+	+	-	-	5
HTLV	+	+	-	+	-	-	-	1

*O critério de discriminação do teste diz que amostras que: $Se (env\ gp46-I + gag\ gp19-I) > env\ gp46-II$, a amostra é positiva para anticorpos HTLV-1.

7 DISCUSSÃO

Um estudo de acurácia diagnóstica avalia a capacidade de um teste em fornecer resultados corretos. Essa capacidade discriminatória pode ser quantificada por medidas de acurácia diagnóstica, para decisões de política de saúde, ou para avaliar a capacidade preditiva de um teste, que são mais úteis para prever a probabilidade de uma doença em um indivíduo ⁽¹³⁶⁾. No presente estudo, após analisar os indicadores quantitativos de desempenho dos testes sorológicos de triagem para HTLV, descrevemos as medidas de acurácia diagnóstica de quatro ensaios comerciais, de acordo com as normas para relatar estudos de acurácia diagnóstica (*Standards for reporting diagnostic accuracy studies – STARD 2015*) ^(146,143).

A capacidade de um teste ou procedimento de diagnóstico para classificar corretamente os indivíduos em duas categorias (positivo e negativo) é avaliada principalmente por dois parâmetros: sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é a probabilidade de um teste apresentar resultado positivo em um indivíduo acometido por uma doença, e a especificidade a probabilidade do teste apresentar resultado negativo em indivíduo sem a doença ^(136,130,147).

No presente estudo os testes de triagem sorológica para o HTLV-1/2 exibiram alto valor diagnóstico. Nossos dados mostram que todos os testes de triagem mostraram sensibilidade de 100%, diagnosticando corretamente as amostras positivas para o HTLV-1/2. Os valores de IR foram superiores a 14 para testes ELISA e 90 para o Architect *r*HTLV-1/2. Em relação aos testes de ELISA, o maior valor de IR foi obtido pelo Murex.

Devido ao elevado número de amostras diagnosticadas erroneamente (4,3%) detectadas pelo teste Murex, sua acurácia foi significativamente menor em comparação aos demais. Os testes Gold ELISA, SYM Solution e Architect *r*HTLV-1/2 atingiram acurácia de 99%, sugerindo que estes kits podem ser empregados com segurança para a triagem da infecção pelo HTLV. Embora o teste Murex seja menos preciso, foi encontrado um valor acima de 95%, indicando que também pode ser usado no diagnóstico da infecção, mas a proporção de amostras que requerem confirmação no WB é maior, aumentando o custo diagnóstico. De fato, 8% das amostras negativas para HTLV testadas com o teste Murex produziram resultados falso-positivos, originando um valor de especificidade de 92%.

Com essas medidas de desempenho diagnóstico podemos verificar uma melhoria do desempenho do teste Murex comparado ao estudo realizado por Jacob et al. (2007), ao analisar 7 kits comerciais, observou que os kits ELISA de 3ª geração não detectaram todos os casos de infecção para HTLV-1/2, destacando o baixo desempenho do ensaio Murex na época (sensibilidade de 98,2% e especificidade de 42,6%)⁽¹⁴⁸⁾. O mesmo grupo em 2009, descreveu um IR~12, nas amostras positivas para HTLV-1 e para HTLV-2, sem diferença entre elas⁽⁸⁵⁾.

No estudo de Berini et al. (2008), ao avaliarem quatro kits de ELISA, o Murex de 2ª geração apresentou sensibilidade de 97,2% e especificidade de 99,7% dentre os analisados⁽¹⁴⁹⁾. No entanto, outros estudos descreveram especificidade um pouco maior do teste Murex que o presente estudo, porém em populações diferentes. O estudo de Campos et al. (2015), com 1608 amostras de indivíduos co-infectados com HIV e HTLV, descreveu sensibilidade de 100% e especificidade de 99% do teste Murex⁽¹⁰⁸⁾.

Outro estudo em Córdoba na Argentina com 20.210 amostras de banco de sangue, descreveu uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98,04% do teste Murex, quando combinado ao ensaio de aglutinação de partículas (PA), propondo que amostras reativas no Murex, com IR entre 0,97– 4,74, sejam repetidas em duplicata por PA, e caso resultem de forma concordante não reativa, seja liberada como negativa para HTLV-1/2, como alternativa para a redução de ensaios confirmatórios⁽¹⁰³⁾.

Não foram encontrados muitos estudos avaliando o kit Gold e nenhum estudo avaliando o kit SYM Solution, possivelmente por serem de distribuição nacional. Apenas o estudo de Campos et al. (2015) avaliou o desempenho do teste Gold e descreve a sensibilidade mais baixa que em nosso estudo para o kit Gold (98%) e uma especificidade maior (100%). Nos ensaios por CLIA observamos que o desempenho do teste Architect rHTLV-1/2 apresentou parâmetros de sensibilidade (100%) e especificidade (98,1%), válidos para um teste de triagem. Outros estudos descreveram desempenho semelhante para este teste.

Estudos em 2010 demonstraram um desempenho robusto do teste Architect rHTLV-I/II, descrevendo a especificidade de 99,95% e 99,86% em amostras de doadores de sangue e pacientes hospitalizados, respectivamente, e a sensibilidade de 100% na detecção em 301 amostras HTLV-1 e 105 HTLV-2⁽¹⁵⁰⁾, e 100% (IC:97.3 – 100) de sensibilidade e 99.80% (IC: 99.50 – 99.95) de especificidade, em 142 amostras reagentes de painéis de soro pré-

caracterizados e amostras de rotina de laboratório clínico, e 2.035 amostras negativas de doadores de sangue, amostras de pacientes com doenças auto-imunes ou outras infecções virais⁽¹⁵¹⁾.

Assim como dados reportados por Qiu et al. (2008) com uma população de 9.276 amostras, dentre estas, doadores de sangue, amostras de diagnóstico e gestantes, descrevem uma sensibilidade de 100%, e especificidade geral de 99,98% (99,92–100%). E um estudo no Reino Unido considerando a alta sensibilidade do teste Architect rHTLV I/II, sugere que órgãos de doadores que apresentaram IR <4.0 podem ser considerados para transplante, dentro do contexto de risco apropriado ou avaliação de benefícios⁽¹⁵²⁾.

Além do Architect rHTLV-I/II, estudos de acurácia diagnóstica de testes de triagem por CLIA para HTLV-1/2, descrevem o desempenho de outros kits além dos avaliados neste estudo. Os testes Elecsys HTLV-I/II, Abbott Prism HTLV-I/HTLV-II e o Architect rHTLV-I/II, e especificidade de 99,95% (99,91-100%) em amostras de doadores de sangue, e de 99,83%, em amostras de diagnóstico de rotina, no teste Elecsys HTLV-I/II⁽⁹⁶⁾.

O teste DiaSorin Liaison XL recHTLV-I/II, apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 99,5% (98,0 – 99,9%) no estudo de Malm et al. (2015)⁽⁹⁹⁾, porém o estudo de Gantner et al. (2017) descreve para este teste uma sensibilidade de 78,8% e uma especificidade de 100%⁽⁹⁸⁾. Em 2016, Ly & Coignard, observaram que o Liaison® XL teve uma concordância geral de 99,7%, entre 663 amostras de rotina⁽⁹⁷⁾.

A avaliação de testes diagnósticos empregando apenas os parâmetros sensibilidade, especificidade e acurácia não é suficiente para medir sua influência nas decisões clínicas⁽¹⁴⁶⁾. A medida de razão de verossimilhança (RV) é um parâmetro bem empregado em estudos diagnósticos sorológicos, pois é útil na descrição do poder discriminatório de um teste e define a possibilidade de um resultado particular entre indivíduos infectados sobre a probabilidade desse mesmo resultado específico entre indivíduos saudáveis⁽¹⁴¹⁾.

Quanto mais alto o RV positivo, mais indicativo é o teste para detecção da infecção. Por outro lado, quanto menor o RV negativo, mais significativo é o teste na exclusão da infecção.^(141,153). Em nosso estudo, o Gold ELISA produziu um RV positivo de 201, indicando que uma pessoa infectada pelo HTLV tem aproximadamente 201 vezes mais chance de ser diagnosticada com

essa infecção se avaliada com este teste. O menor valor de RV positivo foi observado para o teste de Murex^(12,6), revelando uma menor probabilidade de uma pessoa infectada pelo HTLV ser diagnosticada com este vírus.

Por outro lado, um estudo realizado em 2008, com o teste Murex de 2ª geração e utilizando PCR como padrão ouro, com um painel de 478 amostras (86 HTLV-1, 56 soropositivos para HTLV-2 e 336 soronegativos), mostrou um RV positivo de 326,5 (IC: 46.1 - 2311.9) para kit Murex de 2ª geração e definiu sensibilidade de 97.2 (IC: 93.4, 99.1), e especificidade de 99.7 (IC: 98.5, 100)⁽¹⁵⁴⁾. Valores negativos de RV foram menores que 0,001 para os testes avaliados em nosso trabalho.

A *odds ratio* diagnóstica (ORD), calculada pela razão entre os valores RV positivos e negativos, é considerado um parâmetro de desempenho global que resume a acurácia do diagnóstico do teste em único número, que descreve a probabilidade de obter um resultado positivo em uma pessoa com a doença do que em alguém sem a doença^(141,134). No presente estudo o ORD para o Architect rHTLV-1/2 (524.000) foi maior que o obtido para os testes de ELISA. Entre os testes de ELISA, o teste ELISA Gold apresentou o maior valor de ORD (338.200), seguido por SYM Solution (168.254) e Murex (19.552).

Esses achados sugerem que os testes Architect rHTLV-1/2 e Gold ELISA apresentaram desempenho superior ao dos kits SYM Solution e Murex. A determinação de RV e ORD são ferramentas relevantes e estáveis, uma vez que esses parâmetros não dependem da prevalência da doença⁽¹⁵⁵⁾.

Diversos estudos têm discutido o melhoramento do diagnóstico na infecção pelo HTLV-1/2 com avaliação da acurácia de testes, aprimoramento de métodos e propostas de modificação do algoritmo diagnóstico. No entanto, especificamente para os parâmetros de ORD e AUC há escassez de literatura⁽¹⁵⁶⁾, em especial na detecção da infecção pelo HTLV-1/2.

Os testes de triagem sorológica para o HTLV-1/2 exibiram um alto valor diagnóstico no presente trabalho. Os valores de AUC foram superiores a 99%, revelando um ótimo poder discriminatório entre amostras positivas e negativas para HTLV. O Gold ELISA e Architect rHTLV-1/2 apresentaram valores de AUC de 100%. Além disso, ensaios com Murex, SYM Solution e Architect rHTLV-1/2 não mostraram resultados inconclusivos. O Gold ELISA

produziu um baixo número de resultados inconclusivos, apenas uma das 170 amostras positivas para HTLV testadas com este kit produziu um IR na zona cinza.

A AUC, é uma importante medida de acurácia, que informa em um único valor numérico a acurácia diagnóstica global do teste avaliado, pois leva em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade para cada valor da variável do teste. A área sob a curva pode ter qualquer valor entre 0 e 1, sendo um teste de diagnóstico perfeito quando $AUC=1$ ⁽¹⁵⁷⁾. Quanto maior a área sob a curva, melhor será o teste de diagnóstico para discriminar aqueles com e sem doença. Observamos que os testes Architect rHTLV-1/2 e Gold ELISA tiveram uma AUC perfeita.

Com base nos dados acima, acreditamos que todos os testes de triagem avaliados podem ser utilizados com segurança para o rastreamento da infecção pelo HTLV. No entanto, os altos valores de sensibilidade podem levar a resultados falso-positivos, aumentando os custos devido à exigência de confirmação pelo WB. Do ponto de vista de grandes centros de diagnóstico e hemocentros, a seleção adequada do método de rastreamento pode reduzir substancialmente o custo com testes confirmatórios.

Com a finalidade de reduzir custos e garantir o diagnóstico correto, um novo algoritmo de diagnóstico para infecção pelo HTLV-1/2 foi proposto por Costa et al. (2011) ⁽⁴²⁾. Esses autores aconselham o uso de dois testes ELISA para triagem e, em seguida, PCR em tempo real. A confirmação do WB deve ser realizada apenas nos casos de resultados negativos pelo PCR. No presente estudo, 27 amostras indeterminadas no WB foram analisadas pelo PCR, e todas as amostras positivas para HTLV-1 apresentaram concordância com os três testes ELISA. Por outro lado, a concordância geral foi pequena devido ao alto número de resultados falso-positivos produzidos pelos testes ELISA. Adicionalmente testamos 66 amostras positivas para HTLV pelo WB no PCR, e nenhuma deixou de ser classificada como positiva pelo PCR (42 HTLV-1 e 24 HTLV-2).

O trabalho de Campos et al. (2015) ⁽¹⁰⁸⁾, demonstrou que o PCR foi capaz de discriminar dois casos de infecção HTLV não tipados (um HTLV-1 e um HTLV-2) pelo WB e pelo LIA, porém ressalta que a sensibilidade do PCR é mais baixa frente WB (corroborando com COSTA et al. 2011), que classificou 21 amostras como negativas no PCR dentre as 50 amostras positivas no WB e LIA, mas sugere que este fato esteja relacionado ao uso de antirretroviral no grupo

testado⁽¹¹⁷⁾. Neste estudo, todas amostras classificadas como positiva no PCR, foram positivas no WB e LIA. Estes dados sugerem que metodologias baseadas na biologia molecular poderiam ser usadas como confirmatórias anterior ao WB ou LIA, diminuindo os custos do diagnóstico da infecção pelo HTLV.

Diversos estudos avaliam os testes moleculares para o diagnóstico do HTLV-1/2. O estudo de Andrade (2010)⁽¹²²⁾, avaliando um qPCR para detecção de HTLV-1/2, com 318 amostras de doadores de sangue do Hemocentro em Minas Gerais (Brasil), relatam que: de 96 amostras negativas no ELISA, nenhuma foi reagente no PCR; de 21 amostras com resultado de ELISA positivo e WB negativo, duas foram positivas para HTLV-2 no PCR; de 174 amostras positivas no ELISA e no WB, uma foi negativa no PCR; e de 9 amostras reagentes no ELISA e indeterminada no WB, duas eram positivas para HTLV-1 e sete negativas para HTLV-1/2 no PCR, sugerindo uma deficiência no WB em detectar amostras positivas para o vírus do tipo 2. O estudo de Berine (2008), com 478 amostras (86 HTLV-1, 56 HTLV-2 e 336 negativas), observou que todos os 31 resultados indeterminados no WB e as 305 amostras negativas, foram negativas por *nested-PCR*⁽¹⁴⁹⁾.

É possível utilizar como ensaio confirmatório testes de IFI, WB, LIA, ou moleculares, porém evidenciamos que não há um consenso de qual teste confirmatório a ser utilizado. O WB atualmente é o método mais utilizado em todo país, por ser disponível no mercado e ser de fácil execução. Mas, além de ser de alto custo (em torno de R\$ 210,00 reais por amostra), este método apresenta altas taxas de resultados indeterminados⁽¹⁰⁸⁾. No presente estudo 11% das amostras testadas no WB não tiveram o diagnóstico concluído por este. E ao utilizarmos o ensaio LIA como método confirmatório, observamos que o percentual de indeterminados diminuiu para 1,7%. Portanto observamos que mesmo apresentando custo semelhante ao WB (em torno de R\$ 245,00 reais por amostra), e indisponibilidade no mercado nacional, o teste LIA mostrou-se o teste sorológico confirmatório mais eficiente para infecção por HTLV-1/2.

No estudo de Thorstensson *et al.* (2002), com doadores de sangue do Instituto de Controle de Doenças Infecciosas, na Suécia, as taxas de indeterminação do teste confirmatório foram de 50% (146/289) para o WB e 5,9% (17/289) para o LIA⁽³³⁾. Este estudo também mostrou que o teste LIA concordou em 94% (45/48) das amostras identificadas como HTLV-1 pelo WB, concordou em 92% (67/73) das amostras classificadas com HTLV-2 pelo WB, concordou em 16/16 amostras classificadas como indeterminadas pelo WB, e uma amostra classificada como

HTLV-2 pelo WB, foi indeterminada no LIA. O WB classificou 29/289 amostras como negativas, e o LIA classificou 135/289. Nenhuma amostra teve resultado falso negativo pelos dois testes confirmatórios⁽³³⁾.

O estudo de Zrein et al (1998), com amostras positivas de painéis de proficiência comercialmente disponíveis (Boston Biomedica Inc. e do Société Française de Transfusion Sanguine) e amostras europeias negativas para HTLV de doações de sangue, descreve que algumas amostras positivas para HTLV-1 e HTLV-2 diluídas tornaram-se indeterminadas ou negativas pelo WB, enquanto o INNO-LIA HTLV permanece totalmente sensível e discriminatório. Afirmando a capacidade confirmatória da presença da infecção pelo HTLV e discriminatória do tipo de HTLV do teste INNO-LIA, além de reduzir a taxa de soroindeterminação comparada ao WB⁽¹⁰⁵⁾.

O estudo de Campos et al 2015, sugere o LIA como teste confirmatório sorológico de primeira escolha, baseado em estudo onde submeteu os testes LIA, WB e qPCR a 50 amostras positivas para HTLV⁽¹⁰⁸⁾. Como resultado, observou que o teste qPCR caracterizou 21 amostras como negativas para HTLV, o WB classificou uma amostra como negativa e 9 amostras ficaram com o diagnóstico indeterminado, e o LIA não apresentou nenhum resultado indeterminado, e uma amostra foi classificada como negativa. Adicionalmente no estudo de Umeki et al (2017), em Miyazaki no Japão, o LIA foi comparado com PCR (PCR em tempo real para a região pX) e WB (Problot HTLV), e mostrou bons resultados como ensaio confirmatório⁽¹⁵⁸⁾. Todas as amostras negativas em ensaio de triagem CLIA, foram determinadas como negativas pelo LIA e por PCR. Das 70 amostras positivas, 66 apresentaram positividade tanto pelo LIA quanto pelo PCR, 3 amostras foram negativas no LIA e no PCR, e uma amostra (PCR negativo) apresentaram coloração não específica em LIA e WB. O anticorpo GD21 no LIA demonstrou neste estudo alta capacidade de discriminação entre resultados de PCR positivos e negativos.

Em nosso estudo, observamos nas amostras indeterminadas no WB boa reatividade da banda GD2, tanto no WB 2.4 (43/46), quanto no INNO-LIA (46/46). Mas a banda gp46-I/II apresentou mais reatividade no INNO-LIA (30/46) que no WB 2.4 (3/46), sendo esse um dos aspectos importantes na baixa taxa de soroindeterminação do INNO-LIA^(159,160). A concordância baixa entre os testes confirmatórios sorológicos esta relacionada ao maior poder classificatório e discriminatório do INNO-LIA.

Os estudos de Campos et al. (2015; 2017) discutem que a eficiência do ensaio LIA frente ao teste WB, seja explicada pela hipótese de que os antígenos dotados nas tiras de Nylom sejam mais sensíveis do que em tiras de nitrocelulose. E chama atenção para a possibilidade de critérios menos rígidos de interpretação em relação ao WB ^(108,109).

Os critérios de interpretação dos resultados recomendados pelos testes confirmatórios precisam ser revisados. Em nossos resultados, onde 4 amostras que tiveram resultado indeterminado no WB, por apresentar reatividade apenas nas bandas GD21 e p19-I/II, com o mesmo padrão de reatividade de bandas, é considerado positivo para HTLV no ensaio LIA. E ao testarmos amostras positivas para co-infecção HTLV-1 e 2 pelo WB no LIA, este segundo considera as amostras positivas apenas para HTLV-1, pois o critério discriminatório do teste considera a maior intensidade da reatividade entre as bandas rpg46-I e rpg46-II, quando as duas estão presentes. O número de bandas analisados no WB e a pouca clareza nos critérios de classificação dos resultados do WB, são fatores que podem estar relacionados às altas taxas de soroideterminação neste teste.

Contudo, é preciso destacar que o presente trabalho apresenta algumas limitações. Pois não foi possível a realização do teste molecular de todas as amostras de resultado sorológico indeterminado, pois não havia sangue de todas, e o estudo foi realizado com amostras de biorepositório. Não foi possível submeter ao INNO-LIA as 416 amostras do estudo, por conta do custo do teste e dificuldades na aquisição. Também não foi possível a realização da análise pelo método CLIA em todas as 416 amostras, pois o mesmo requer uma quantidade de amostra (mínimo de 163 μ) não disponível.

8 CONCLUSÕES

Com base em nossos achados, concluímos que os testes comerciais para triagem sorológica para HTLV-1/2 usados no Brasil são seguros para detecção desta infecção. Os kits de 3ª geração apresentaram alta sensibilidade e maior valor de especificidade em relação aos estudos anteriores. Evidenciamos de que o kit Gold HTLV-1/2 possui os melhores parâmetros de desempenho entre os testes ELISA. No entanto, quando o CLIA é analisado em conjunto, o Architect rHTLV-1/2 apresentou o maior desempenho. Porém são necessários mais estudos de acurácia diagnóstica dos testes de triagem para HTLV-1/2 empregando RV, ORD e AUC como parâmetros de análise do desempenho, especialmente no Brasil que apresenta taxas elevadas dessa infecção.

Considerando a alta sensibilidade associada a especificidade mais baixa dos testes de triagem, levando a alta proporção de resultados falso-positivos, é necessária uma combinação de testes de melhor custo-benefício. Para tanto é imprescindível padronização dos testes moleculares para investigações mais consistentes.

Os critérios de interpretação dos resultados dos dois testes confirmatório precisam ser revisados. O teste INNO-LIA possui critérios de confirmação da infecção mais claros que o WB 2.4. Porém é necessária uma revisão dos critérios de discriminação da infecção recomendadas pelo INNO-LIA, para viabilizar a caracterização de amostras positivas para co-infecção pelos tipos 1 e 2 do HTLV. E uma revisão do número de bandas adotadas no WB, bem como uma descrição mais clara sobre a interpretação dos resultados indeterminados, pois esses fatores aumentam a chance de erro na interpretação dos resultados. Além disso, se faz necessária uma análise aprofundada da proteína GD21 nos dois testes confirmatórios. Contudo, de acordo com nossos dados e outros estudos, o teste INNO-LIA parece ser a melhor escolha dentre os testes confirmatórios sorológicos, pela sua eficácia e por dispensar infraestrutura complexa para sua implantação e execução.

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* [Internet]. 1980 Dec;77(12):7415–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261256>.
2. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Nakao Y, Ito Y, Aoki T, Gallo RC. Natural antibodies to the structural core protein (p24) of the human T-cell leukemia (lymphoma) retrovirus found in sera of leukemia patients in Japan. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1982 Mar;79(5):1653–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6951204>.
3. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1985;2(8452):407–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2863442>.
4. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I Associated Myelopathy, A New Clinical Entity. *Lancet* [Internet]. 1986;327(8488):1031–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673686912985>.
5. Yoshida M, Miyoshi I HY. 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.
6. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(10):6476–80.
7. Mochizuki M, Yamaguchi K, Takatsuki K, Watanabe T, Mori S, Tajima K. HTLV-I and uveitis. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1992;339(8801):1110. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1349119>.
8. Grenade L La. Dermatology in the Caribbean. *Arch Dermatol* [Internet]. 1995;131(5):596. Available from: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archderm.1995.01690170098015>.
9. Ijichi S, Matsuda T, Maruyama I, Izumihara T, Kojima K, Niimura T, et al. Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1990 Sep;49(9):718–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2241290>.
10. Nishioka K, Sumida T HT. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum*. 1996;39:1410–8.
11. Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1989 Nov 18;2(8673):1184–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2572904>.

12. Biswas HH, Kaidarova Z, Garratty G, Gibble JW, Newman BH SJ e. al. Increased all-cause and cancer mortality in HTLV-II infection. *J Acquir Imm Defic Syndr*. 2010;54:290–6.
13. Biglione M. M., Pizarro M., Puca A., Salomon H. E. BMI. A cluster of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Jujuy, Argentina. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;32:441–445.
14. Silva EA, Otsuki K, Leite AC, Alamy AH, Sá-Carvalho D VA. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. *J Med Virol*. 2002;66:253–7.
15. Murphy EL, Mahieux R, de The G, Tekaia F, Ameti D HJ& GA. Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug users: an age-cohort effect for HTLV-II RFLP type aO. *Virology*. 1998;242:425–34.
16. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 2005;2:30.
17. 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 [Internet]*. 2005 May 31;102(22):7994–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501734102>.
18. European Centre for Disease Prevention and Control. Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection. ECDC. 2015.
19. Gessain A1 CO. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol [Internet]*. 2012;15(3):388. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162541>.
20. Carneiro-proietti F, Catalan-soares BC, Proietti FA, Ba A, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005;24:6058–6.
21. 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 Sao Paulo [Internet]*. 2015 Feb;57(1):01-14. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652015000100001&lng=en&tlng=en.
22. Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr [Internet]*. 2003 Dec 15;34(5):527–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657765>.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV. Brasil. Ministério da Saúde. 2003.

24. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n^o 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. 1993.
25. Soriano V, Vallejo A, Gutiérrez M, Tuset C, Cilla G, Martínez-Zapico R, et al. Epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in Spain. HTLV Spanish Study Group. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 1996 Dec;12(6):625–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982623>.
26. Andersson S, Thorstensson R, Ramirez KG, Krook A, von Sydow M, Dias F, et al. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. *Transfusion* [Internet]. 1999 Aug;39(8):845–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504120>.
27. Soriano V, Gutiérrez M, Tuset C, Martínez-Zapico R CE, González-Lahoz. Avoiding false-negative results for HTLV-II using new serological assays. *Am J Med*. 1995;98:103.
28. Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods* [Internet]. 2009 Mar;156(1–2):150–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992771>.
29. Anna Abrams,* Yoshimi Akahata and SJ. The Prevalence and Significance of HTLV-I/II Seroindeterminate Western Blot Patterns. *Viruses* [Internet]. 2011;3(8):1320–1331. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185804/>.
30. Vitone F, Gibellini D, Schiavone P, D’antuono A, Gianni L, Bon I et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) prevalence and quantitative detection of DNA proviral load in individuals with indeterminate/positive serological results. *BMC Infect Dis*. 2006;6:41.
31. Abbaszadegan MR, Gholamin M, Tabatabaee A, Farid R, Houshmand M, Abbaszadegan M. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 among blood donors from Mashhad, Iran. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2003;41(6):2593–5. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.6.2593-2595.2003%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC156501/pdf/0995.pdf>.
32. Leon G, Quiros AM, Lopez JL, Hung M, Diaz AM, Goncalves J, Da Costa O, Hernandez T CM& GR. Seropositivity for HTLV types I and II among donors at the Municipal Blood Bank of Caracas and associated risk factors. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;13:117–23.
33. Thorstensson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV I and -II. *Transfusion* [Internet]. 2002 Jun;42(6):780–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147033>.
34. Rouet F, Meertens L, Courouble G, Herrmann-Storck C, Pabingui R, Chancerel B, et al. Serological, Epidemiological, and Molecular Differences between Human T-Cell

- Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Seropositive Healthy Carriers and Persons with HTLV-I Gag Indeterminate Western Blot Patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2001 Apr 1;39(4):1247–53. Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.4.1247-1253.2001>.
35. Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Sáez-Alquézar A. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1999 May;37(5):1324–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203479>.
 36. Caterino-de-Araujo A, de los Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, et al. Sensitivity of Two Enzyme-linked Immunosorbent Assay Tests in Relation to Western Blot in Detecting Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II Infection among HIV-1 Infected Patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1998 Mar;30(3):173–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889397002368>.
 37. Maan Zrein, Joost Louwagie, Hilde Boeykens, Loeki Govers Gh, Fons Bosman, Erwin Sablon, Catherine Demarquilly Mb, Saman Ae, Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, et al. Assessment of a New Immunoassay for Serological Confirmation and Discrimination of Human T-Cell Lymphotropic Virus Infections. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 1998;5(1):45–49. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=121390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 38. Ishak R, Ishak MO, Azevedo VN, Santos DE, Vallinoto AC, Saraiva JC, Crescente JA HW. Detection of HTLV-IIa blood donors in an urban area of the Amazon Region of Brazil (Belém, PA). *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31(2):193–7.
 39. Casseb J, Souza T, Pierre-Lima Mt, Yeh E, Hendry Mr GD. Testing problems in diagnosing HTLV infection among intravenous drug users with AIDS in São Paulo city, Brazil. *AIDS Res Hum Retrovir*. 1997;13:1639–41.
 40. 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 Sao Paulo* [Internet]. 2007;49(4):225–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823751>.
 41. Gallo D, Diggs JL, Hanson C V. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus western blot (immunoblot) kits with problem specimens. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1994 Sep;32(9):2046–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814523>.
 42. Costa A, Barreto-Damião Ch, Magri2 Mc, Kuen W, Alencar, 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. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 2011;74(1):57–65.
 43. Kobayashi N, Konishi H, Sabe H, Shigesada K, Noma T, Honjo T, et al. Genomic structure of HTLV (human T-cell leukemia virus): detection of defective genome and

- its amplification in MT-2 cells. *EMBO J* [Internet]. 1984 Jun;3(6):1339–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6086318>.
44. Delamarre, Lélia; Rosenberg, Arielle R.; Pique, Claudine; Pham, Danièle; Callebaut, Isabelle*; Dokh lar M-C. The HTLV-I Envelope Glycoproteins: Structure and Functions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1996;13:S85–91.
 45. Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(4):266–81.
 46. Michael D Lairmore Robyn Haines Rajaneesh Anupam. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):474–81.
 47. Saito M. Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1-)Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip Perspect Infect Dis* [Internet]. 2010;478461. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169122>.
 48. Boxus M, Willems L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. *Br J Cancer* [Internet]. 2009 Nov 3;101(9):1497–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861996>.
 49. Kitagawa T, Tadokoro H, Fujishita M, Taguchi H MI. Antibodies to HTLV-1 in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA* [Internet]. 1986 Nov 7;256(17):2342–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3464765>.
 50. Galvão-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* [Internet]. 1997 Feb;37(2):242–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9051104>.
 51. Catalan-Soares, Bernadette; Carneiro-Proietti, Anna Bárbara De F.; 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* [online]. 2005;21(3):926–31.
 52. Mota AC de F. Estudo dos Determinantes de Risco para Infec o pelo HTLV em Doadores de Sangue do Estado da Bahia e Caracteriza o Genotípica dos Isolados Virais. Tese – Esc Bahiana Med. 2006;46.
 53. Dourado I, Andrade T, Carpenter CL, Galvão-Castro B. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 1999;94(1):13–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029907>.
 54. Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB, Santos M, Valad o E, Alcantara LC, et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2001 Apr 15;26(5):490–

4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391171>.
55. Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*. 1992;51(6):886–91.
 56. Dourado I, Andrade T G-CB. HTLV-I in Northeast Brazil: differences for male and female injecting drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc*. 1998;19(4):426–9.
 57. Saji F, Ohashi K, Tokugawa Y, Kamiura S, Azuma C TO. Perinatal infection of human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of adult T-cell leukemia/lymphoma. DNA amplification of specific human T-lymphotropic virus type I sequences. *Cancer*. 1990;66(9):1933–7.
 58. Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P DA. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. 1990;64(11):5682–7.
 59. Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ M-LA. B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology*. 2009;6:104.
 60. Ali A, Patterson S, Cruickshank K, Rudge P, Dalgleish Ag KS. Dendritic cells infected in vitro with human T cell leukaemia/lymphoma virus type-1 (HTLV-1); enhanced lymphocytic proliferation and tropical spastic paraparesis. *Clin Exp Immunol*. 1993;94:32–7.
 61. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M BJ. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003;115(4):449–59.
 62. Manel N, Kinet S, Kim FJ, Taylor N, Sitbon M, Battini J-L. GLUT-1 is the receptor of retrovirus HTLV. *Med Sci (Paris) [Internet]*. 2004 Mar;20(3):277–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067572>.
 63. Seiki M, Eddy R, Shows TB YM. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature*. 1984;309(5969):640–2.
 64. Bindhu M, Nair A LM. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front Biosci*. 2004;9:2556–76.
 65. Lavorgna A, Harhaj EW. Regulation of HTLV-1 tax stability, cellular trafficking and NF- κ B activation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Viruses [Internet]*. 2014 Oct 23;6(10):3925–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25341660>.
 66. Bangham CRM. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol*. 2003;84:3177–89.
 67. Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, Bangham CRM. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron

- tomography. PLoS One [Internet]. 2008 May 28;3(5):e2251. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2386264>.
68. Asquith B, Mosley AJ, Barfield A, Marshall SE, Heaps A, Goon P et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. *J Gen Virol*. 2005;86(5):1515–23.
 69. Kannian P, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* [Internet]. 2010 Sep;2(9):2037–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994719>.
 70. Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogawa T, Matsuoka M, Matsumoto T, et al. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* [Internet]. 2009 Aug 1;90(8):1806–11. Available from: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.010199-0>.
 71. Andrade RG, Gonçalves P de C, Ribeiro MA, Romanelli LC, Ribas JG, Torres EB et al. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: distinct markers for the neurologic disease. *J Clin Virol*. 2013;56:135–40.
 72. Norris PJ, Hirschorn DF, DeVita DA, Lee TH M EL. Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells. *Virulence*. 2010;1(1):19–28.
 73. Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvão-Castro B NF. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001;27:1–6.
 74. Biddison WE, Kubota R, Kawanishi T, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-1)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-1-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol*. 1997;159:2018–25.
 75. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Luna T, Nascimento MC, Guerreiro JB et al. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(3):145–51.
 76. Jacobson S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *J Infect Dis* [Internet]. 2002 Dec 1;186 Suppl:S187-92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424696>.
 77. Constantine NT, Callahan JD, Watts DM. *Retroviral Testing. Essential for Quality Control and Laboratory Diagnosis*. 1992. 105-107 p.
 78. Jones KS, Nath M, Petrow-Sadowski C, Baines AC, Dambach M, Huang Y, et al. Similar regulation of cell surface human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) surface binding proteins in cells highly and poorly transduced by HTLV-1-pseudotyped virions. *J Virol* [Internet]. 2002 Dec;76(24):12723–34. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438598>.
79. R M Bangham C. The immune response to HTLV-I. *Curr Opin Immunol*. 2000;12(4):397–402.
 80. Couroucé AM, Pillonel J, Saura C. Screening of blood donations for HTLV-I/II. *Transfus Med Rev* [Internet]. 1999 Oct;13(4):267–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553270>.
 81. Thorstensson R, Albert J AS. Strategies for diagnosis of HTLV I and -II. *Transfusion*. 2002;42(6):780–91.
 82. CDC C for DC and P. Recommendations for counseling persons infected with human T-lymphotropic virus, types I and II. 1988.
 83. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. *Diário Of da União, Brasília*. 1993.
 84. Hartley Mt, Malone Ge, Khabbaz Rf, Lal Rb Kj. Evaluation of a recombinant human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p21E antibodies detection enzyme immunoassay as a supplementary test in HTLV-I/II antibody testing algorithms. *J Clin Microbiol*. 1991;29:1125–7.
 85. Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-fortuna E, Caterino-de-araujo A. Comparison of signal-to-cutoff values in first , second , and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1 / 2 infection in “ at-risk ” individuals from São Paulo , Brazil. *J Virol Methods*. 2009;159:288–90.
 86. Wiktor SZ, Pate EJ, Weiss SH, Gohd RS, Correa P, Fontham ET, et al. Sensitivity of HTLV-I antibody assays for HTLV-II. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1991 Aug 24;338(8765):512–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1678470>.
 87. Kline RL, Vlahov D, Quinn TC. Improved detection of HTLV-II antibody using a whole viral lysate-based EIA. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 1994 Dec;7(12):1291–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965644>.
 88. Olaleye DO, Ekweozor CC, Sheng Z, Rasheed S. Evidence of serological cross-reactivities with human immunodeficiency virus types 1 and 2 and human T-lymphotropic virus types I and II in sera of pregnant women in Ibadan, Nigeria. *Int J Epidemiol* [Internet]. 1995 Feb;24(1):198–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797344>.
 89. Kamihira S, Nakashima S, Saitoh S, Kawamoto M, Kawashima Y, Shimamoto M. Chemiluminescence immunoassay to detect anti-HTLV-I antibodies. *Jpn J Cancer Res* [Internet]. 1993 Aug;84(8):834–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407545>.
 90. Berini CA, Susana Pascuccio M, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodriguez C, et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell Lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods* [Internet]. 2008 Feb;147(2):322–7.

Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093407003734>.

91. Verdonck K1, González E, Maldonado F, Agapito D, Van Dooren S, Vandamme AM, Silva-Santisteban A, Vanham G, Clark D GE. Comparison of three ELISAs for the routine diagnosis of human T-lymphotropic virus infection in a high-prevalence setting in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 2009;103(4):420–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155035>.
92. Abbott Laboratories. Architect rHTLV-I/II. Packag Inser Abbott Lab Abbott Park IL. 2008.
93. Abbott Laboratories. Abbott Prism HTLV-I/HTLV-II. Prod information Abbott Lab Abbott Park IL. 2007.
94. Qiu X, Hodges S, Lukaszewska T, Hino S, Arai H, Yamaguchi J, et al. Evaluation of a new, fully automated immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies. *J Med Virol* [Internet]. 2008 Mar;80(3):484–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21083>.
95. Kapprell H-PP, Stieler M, Oer M, Goller A, Hausmann M, Schochetman G, et al. Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II assay for blood screening and diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010 May;67(1):61–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889309005124>.
96. Laperche S, Saulea S PM, Mühlbacher A, Schennach H S V, Queirós L, Uno N, Yanagihara K, Imdahl R H, A, Klinkicht M, Melchior W MP, T. W. Evaluation of Sensitivity and Specificity Performance of Elecsys HTLV-I/II Assay in a Multicenter Study in Europe and Japan. *Clin Microbiol*. 2017;55:2180 –2187.
97. Ly TD, Coignard C. Performance of the LIAISON® XL murex recHTLV-I/II assay. *J Clin Virol* [Internet]. 2016 Sep;82:S88–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653216303687>.
98. Gantner P, Velay A, Guigue N, Barth H, Wendling M-J, Delaugerre C, et al. Performance of the Liaison® XL Murex recHTLV-I/II Immunoassay in the Detection of HTLV-1/2 Antibodies in Serum. *Clin Lab* [Internet]. 2017 May 1;63(5):997–1001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28627820>.
99. Malm K, Kragstjerg E, Andersson S. Performance of Liaison XL automated immunoassay platform for blood-borne infection screening on hepatitis B, hepatitis C, HIV 1/2, HTLV 1/2 and *Treponema pallidum* serological markers. *Transfus Med* [Internet]. 2015 Apr;25(2):101–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779614>.
100. K. Takahashi, M. Murata, H. Karasawa, A. Kaneko KA. Performance evaluation of LumipulseG HTLV-I/II. *Clin Chem*. 2017;63:S158.
101. Ikeda, M., R. Fujino, T. Matsui, T. Yoshida, H. Komoda and J. Imai. A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. *Gann*.

- 1984;75:845–848.
102. Fujino R, Kawato K, Ikeda M, Miyakoshi H, Mizukoshi M, Imai J. Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. *Jpn J Cancer Res* [Internet]. 1991 Apr;82(4):367–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1904415>.
 103. 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* [Internet]. Elsevier; 2013;45(3):165–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(13\)70019-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(13)70019-1).
 104. Gallo D, Penning LM HC. Detection and differentiation of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types I and II by the immunofluorescence method. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2345–7.
 105. Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G, Bosman F, et al. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 1998;5(1):45–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=121390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 106. Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Sáez-Alquézar A, et al. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1999 May;37(5):1324–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10203479>.
 107. Innogenetics N V. INNO-LIA™ * HTLV I / II Score. Interpret A J Bible Theol. 2004.
 108. Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Caterino-de-Araujo A. 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). *Rev Inst Adolfo Lutz* [Internet]. 2015 May;74(1):57–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867016304305>.
 109. Campos KR, Gonçalves MG, Caterino-de-Araujo A. Failures in Detecting HTLV-1 and HTLV-2 in Patients Infected with HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2017;33(4):382–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27750018>.
 110. Filippone C1, Bassot S, Betssem E, Tortevoeye P, Guillotte M, Mercereau-Puijalon O, Plancoulaine S, Calattini S GA. A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1663–72.
 111. Stramer SL, Townsend RL, Foster GA, Johnson R, Weixlmann B, Dodd RY. Discordant human T-lymphotropic virus screening with Western blot confirmation: evaluation of the dual-test algorithm for US blood donations. *Transfusion* [Internet].

- 2018 Mar;58(3):638–40. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29322517>.
112. Glasser L, Cyrus S, Machan JT, Mapother J. Human T-lymphotropic virus laboratory testing of maternal blood at time of cord blood donations and clinical implications. *Transfusion* [Internet]. 2013 Jun;53(6):1302–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998131>.
 113. Santos, Terezinha de Jesus Teixeira Santos; Carlos Maurício de Castro Costa; Patrick Goubau; Anne-Mieke Vandamme; Jan Desmyter; Sonia Van Dooren; Rosa M. S. Mota; Francine Bovy de Castro Costa; Ana C. S. Oliveira; Vânia Barreto A.F. Gomes; Anna B. Carneiro-Proiet. Western blot seroindeterminate individuals for Human T-lymphotropic Virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis*. 2003;7(3).
 114. de Araujo AC, Casseb JS, Neitzert E, de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, et al. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in Sao Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol* [Internet]. 1994 Apr;10(2):165–71. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7813694>.
 115. Vallinoto ACR, Azevedo VN, Santos DEM, Caniceiro S, Mesquita FCL, Hall WW, et al. Serological Evidence of HTLV-I and HTLV-II Coinfections in HIV-1 Positive Patients in Belém, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(3):407–9.
 116. Lal RB, Brodine S, Kazura J, Mbidde-Katonga E, Yanagihara R, Roberts C. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1992 Feb;30(2):296–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347047>.
 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* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;173(2):280–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.018>.
 118. Lal RB, Rudolph DL, Coligan JE, Brodine SK RC. Failure to detect evidence of human T-lymphotropic virus (HTLV)type I and type II in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV I/II. *Blood*. 1992;80:544–50.
 119. Vrieling H, Zaaijer HL, Cuypers HTM, van der Poel CL, Woerdeman MLP et al. Evaluation of a new HTLV-I/II polymerase chain reaction. *Vox Sang*. 1997;72:144–7.
 120. Estes MC SJ. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV I or II. *Mol Cell Probes*. 2003;17:59–68.
 121. Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC LJ. HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo*. 2006;39:548–52.

122. Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-lobes MSS, Silva SMN, Basques FV, Ribas JG, et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(2):111–5.
123. Costa, J.M.; Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from Sao Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2009;44:185–189.
124. Ishihara K, Inokuchi N, Tsushima Y, Tsuruda K, Morinaga Y, Hasegawa H, et al. Relevance of Molecular Tests for Htlv-1 Infection As Confirmatory Tests After the First Sero-Screening. *J Immunoass Immunochem [Internet].* 2014;35(1):74–82. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15321819.2013.792832>.
125. Poiesz BJ, Dube S, Choi D, Esteban E, Ferrer J L-PM et al. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. *Transfusion.* 2000;40:924–30.
126. Roberts BD, Fong SK, Lipka JJ, Kaplan JE, Hadlock KG, Reyes GR, et al. Evaluation of an immunoblot assay for serological confirmation and differentiation of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *J Clin Microbiol [Internet].* 1993;31(2):260–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=262746&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
127. Rutjes AW, Reitsma JB, Di Nisio M, Smidt N, van Rijn JC BP. Evidence of bias and variation in diagnostic accuracy studies. *CMAJ.* 2006;174:469–76.
128. Whiting P, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PMM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. *BMC Med Res Methodol [Internet].* 2003 Nov 10;3:25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14606960>.
129. Oliveira MRF de, Gomes A de C, Toscano CM. QUADAS and STARD: evaluating the quality of diagnostic accuracy studies. *Rev Saude Publica.* 2011;45(2):416–22.
130. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. stard-statement.org. 2015.
131. Whiting P, Rutjes AW, Dinnes J, Reitsma J, Bossuyt PM KJ. Development and validation of methods for assessing the quality of diagnostic accuracy studies. *Heal Technol Assess.* 2004;8(25):1–234.
132. Christian Gluud LLG. Evidence based diagnostics. *BMJ.* 2005;330:724–6.
133. Carlos, R., Gareen, I., Gatsonis, C., Gorelick, J., Kessler, L., Lau, J., Rutter, C., Schmid, C., Tosteson, A. N. A., Trikalinos T. Standards in the Design, Conduct and Evaluation of Diagnostic Testing for Use in Patient Centered Outcomes Research. PCORI. PCORI [Internet]. 2012; Available from:

- <http://www.pcori.org/assets/Standards-in-the-Design-Conductand-Evaluation-of-Diagnostic-Testingfor-Use-in-Patient-Centered-Outcomes-Research.pdf>.
134. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PMM. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2003 Nov;56(11):1129–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089543560300177X>.
 135. Nendaz MR, Perrier A. Sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative d'un test diagnostique. *Rev Mal Respir* [Internet]. 2004 Apr;21(2):390–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0761842504713005>.
 136. Šimundić A-M. Measures of Diagnostic Accuracy: Basic Definitions. *EJIFCC* [Internet]. 2009 Jan;19(4):203–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27683318>.
 137. Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W HR. *Evidence-Based Medicine: How to Practice and Teach EBM*. 2ed ed. Artmed, editor. London; 2003. 103-10 p.
 138. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* [Internet]. 1994 Jun 11;308(6943):1552. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8019315>.
 139. Eusebi P. Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc Dis*. 2013;36(4):267–72.
 140. McGee S. Simplifying likelihood ratios. *J Gen Intern Med* [Internet]. 2002 Aug;17(8):647–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1046/j.1525-1497.2002.10750.x>.
 141. Sackett DL, Straus S. On some clinically useful measures of the accuracy of diagnostic tests. *ACP J Club* [Internet]. 129(2):A17-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9749135>.
 142. Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*. 2007;115(5):654–7.
 143. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* [Internet]. 1977;33(1):159. Available from: <http://www.jstor.org/stable/2529310?origin=crossref>.
 144. Mboudjeka I, Zekeng L, Yamashita M, Takehisa J, Ido E, Miura T, et al. Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-I isolates in Cameroon, including those of the Baka Pygmy. *Jpn J Cancer Res* [Internet]. 1997 Jul;88(7):619–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310132>.
 145. Alcantara LC, Shindo N, Van Dooren S, Salemi M, Costa MC, Kashima S, Covas DT, Vandamme AM G-CB. Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19(6):519–23.

146. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* [Internet]. 2015 Oct 28;h5527. Available from: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.h5527>.
147. Um O, CN O. Evaluating Measures of Indicators of Diagnostic Test Performance: Fundamental Meanings and Formulars. *J Biom Biostat* [Internet]. 2012;03(01). Available from: <https://www.omicsonline.org/evaluating-measures-of-indicators-of-diagnostic-test-performance-fundamental-meanings-and-formulars-2155-6180.1000132.php?aid=4054>.
148. Jacob F, Santos-Fortuna E de los, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev do Inst Med Trop São Paulo* [Internet]. 2007;49(6):361–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18157402>.
149. Berini CA, Susana Pascuccio M, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodriguez C, et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods*. 2008;147(2):322–7.
150. Kapprell HP, Stieler M, Oer M, Goller A, Hausmann M, Schochetman G, et al. Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II assay for blood screening and diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;67(1):61–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227221>.
151. Malm K, Kjerstadius T, Andersson S. Evaluation of a new screening assay for HTLV-1 and -2 antibodies for large-scale use. *J Med Virol* [Internet]. 2010 Jul 15;82(9):1606–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21867>.
152. Tosswill JHC TG. Interpretation of low reactivity in the Abbott Architect rHTLV I/II assay. *Transfus Med*. 2017.
153. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ* [Internet]. 1994 Jul 9;309(6947):102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8038641>.
154. Berini Ca, Pascuccio Ms, Bautista Ct, Gendler Sa Em, Al. Rc et. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods*. 2008;147:322–7.
155. Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Souza WV de, da Silva ED, Foti L, et al. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease – a Phase II study. Schallig HDFH, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2017 Mar 8;11(3):e0005433. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005433>.
156. Chad Cook, Joshua Cleland and PH. Creation and Critique of Studies of Diagnostic Accuracy: Use of the STARD and QUADAS Methodological Quality Assessment Tools. *J Man Manip Ther*. 2007;15(2):93–102.
157. Zhou W, Li H, Gu Y, Yu L, Han J, Xu W, et al. The ROC analysis for different time points during oral glucose tolerance test. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;72:88–92.

158. Umeki K, Umekita K, Hashikura Y, Yamamoto I, Kubo K, Nagatomo Y OA. Evaluation of Line Immunoassay to Detect HTLV-1 Infection in an Endemic Area, Southwestern Japan; Comparison with Polymerase Chain Reaction and Western Blot. *Clin Lab*. 2017;63(2):227–33.
159. Lipka JJ, Miyoshi I, Hadlock KG, Reyes GR, Chow TP, Blattner WA, Shaw GM, Hanson CV, Gallo D, Chan L et al. Segregation of human T cell lymphotropic virus type I and II infections by antibody reactivity to unique viral epitopes. *J Infect Dis*. 1992;165(2):268–72.
160. Varma M, Rudolph DL, Knuchel M, Switzer WM, Hadlock KG VM et al. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by Western blot (Immunoblot) assay containing recombinant envelope glycoproteins. *J Clin Microbiol*. 1995;33:3239–44.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Artigo publicado: Performance of commercially available serological tests for human T-cell lymphotropic vírus infection in Brazil

JCM Accepted Manuscript Posted Online 19 September 2018

J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.00961-18

Copyright © 2018 Brito et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

1 **Performance of commercially available serological screening tests for human T-cell**
 2 **lymphotropic virus infection in Brazil**

3

4 **Short title:** Performance of screening tests for HTLV infection

5

6 Vanessa da Silva Brito,^a Fred Luciano Neves Santos,^b Noilson Lazaro Sousa Gonçalves,^{a,b}

7 Thessika Hialla Araujo,^a Davi Silva Vale Nascimento,^a Felicidade Mota Pereira,^c Ney

8 Cristian Amaral Boa-Sorte,^a Maria Fernanda Rios Grassi,^{a,b} Adele Caterino-de-Araujo,^d

9 Bernardo Galvão-Castro^{a,b#}

10

11 ^aIntegrated and Multidisciplinary HTLV Center, Bahiana School of Medicine and Public
 12 Health (EBMSP), Salvador, Bahia, Brazil

13 ^bAdvanced Laboratory of Public Health, Gonçalo Moniz Institute (IGM), FIOCRUZ-BA,
 14 Salvador, Bahia, Brazil

15 ^cGonçalo Moniz Public Health Central Laboratory (LACEN-BA), Bahia State Department
 16 of Health, Bahia, Brazil

17 ^dAdolfo Lutz Institute, São Paulo, São Paulo, Brazil

18

19 #Address correspondence to Bernardo Galvão-Castro, bgalvao@bahiana.edu.br.

20

21 VSB and FLNS contributed equally to this work.

22

23 **KEYWORDS** HTLV; Screening tests; Diagnostic reagent kits

24 **ABSTRACT** Serological screening for HTLV-1 is usually performed using enzyme-linked
25 immunosorbent assay, particle agglutination or chemiluminescence assay kits. Due to antigen
26 matrix improvement entailing the use of new HTLV-antigens and changes in the format of
27 HTLV screening tests, as well as newly introduced CLIAs, a systematic evaluation of the
28 accuracy of currently available commercial tests is warranted. We aimed to assess the
29 performance of commercially available screening tests for HTLV diagnosis. A diagnostic
30 accuracy study was conducted on a panel of 397 plasma samples: 200 HTLV-negative, 170
31 HTLV-positive and 27 indeterminate under Western blotting analysis. WB-indeterminate
32 samples (i.e. those yielding no specific bands for HTLV-1 and/or HTLV-2) were assessed by
33 PCR and results were used to compare agreement among the commercially available ELISA
34 screening tests. For performance analysis, WB-indeterminate samples were excluded,
35 resulting in a final study panel of 370 samples. Three ELISA kits (Murex HTLV-1/2, anti-
36 HTLV-1/2 SYM Solution and Gold ELISA HTLV-1/2) and one CLIA kit (Architect r-
37 HTLV-1/2) were evaluated. All screening tests demonstrated 100% sensitivity. Concerning
38 the HTLV-negative samples, SYM Solution and Gold ELISA kits had specificity values
39 >99.5%, while the Architect r-HTLV-1/2 test presented 98.1% specificity, followed by
40 Murex (92.0%). Regarding the 27 samples with WB-indeterminate results, after PCR
41 confirmation, all ELISA kits showed 100% sensitivity, but low specificity. Accuracy findings
42 were corroborated by Cohen's Kappa, which evidenced slight and fair agreement between
43 PCR analysis and ELISA tests for HTLV diagnosis. Based on the data, we believe that all
44 evaluated tests can be safely used for HTLV-infection screening.

45

46

47 Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) were identified in
48 1980 and 1982, respectively (1, 2). Subsequently, HTLV-3 and HTLV-4 were discovered in
49 2005 (3, 4). It has been estimated that at least 10 million people harbor HTLV-1 worldwide
50 (5). Large foci of this infection exist in Japan, Africa, the Caribbean Islands, Melanesia,
51 Australia, the Mashhad area of northeastern Iran and South America (5–7). HTLV-1 is
52 associated with, or causes, a broad range of inflammatory conditions and a severe
53 proliferative disease (5, 8–14).

54 HTLV-2 infection is endemic in native Amerindian populations in both North and
55 South America, certain tribes of Pygmies in Africa and in intravenous drug users (IDUs) in
56 urban areas around the world (15, 16). In contrast to HTLV-1, this type rarely is associated
57 with neurological or lymphoproliferative disorders (17). HTLV-3 and HTLV-4 are restricted
58 to Western Africa and have not yet been associated with any diseases (3, 4).

59 Brazil, a country of 200 million inhabitants, has a population of 800,000 who
60 potentially harbor HTLV-1, representing one of the largest endemic areas for the virus and
61 its associated diseases anywhere in the world (5). The virus is disseminated throughout the
62 country, with higher rates found in the Northeast and Northern regions compared with the
63 South and Southeast (18, 19). HTLV-2 is present mainly in the North, among indigenous
64 populations and in IDUs in urban centers (17).

65 Achieving an accurate diagnosis of HTLV infection is a complex task. Serological
66 screening for HTLV-1 is usually performed using enzyme-linked immunosorbent assay
67 (ELISA), particle agglutination testing or chemiluminescence assay (CLIA) kits. The
68 Brazilian Ministry of Health recommends the use of ELISA or particle agglutination tests as
69 a screening protocol. Western blotting (WB) or immunoblot is used for confirmation, and
70 polymerase chain reaction (PCR) is employed in the case of inconclusive confirmatory test

71 results (20). Among the screening options, ELISA is used most extensively due to an elevated
72 level of automation, simplicity and low cost. ELISA performance depends on antigen
73 composition and assay format (21–24). Tests providing low accuracy present a public health
74 problem, as false-positive results can have a negative impact, not only economically due to
75 the need for confirmation by WB, but also on individuals' quality of life.

76 In light of this scenario, we endeavored to conduct a systematic evaluation of the
77 commercial screening test kits for HTLV diagnosis. Statistical tools were used to obtain a
78 robust assessment of the performance of each molecule by determining the following
79 diagnostic test parameters: sensitivity (probability of test being positive in the presence of
80 infection) and specificity (probability of test being negative in the absence of infection).

81

82 **MATERIAL AND METHODS**

83 **Ethical considerations.** The present research protocol was approved by the
84 Institutional Research Board (IRB) of the Bahiana School of Medicine and Public Health
85 (EBMSP) in Salvador (protocol no. 464.286). All procedures were performed in accordance
86 with the principles established in the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

87 **Sample selection.** The present diagnostic accuracy study was carried out between
88 February 2015 and December 2017 using anonymous plasma samples obtained from the
89 biorepository of the Integrated and Multidisciplinary HTLV Center (CHTLV) at EBMSP.
90 CHTLV is an outpatient clinic, open to the public, that provides inter-disciplinary care and
91 services, including general medical treatment, laboratory diagnosis, psychological
92 counseling and physical therapy. All included plasma samples had been previously screened
93 for antibodies against HTLV-1/2 using an enzyme-linked immunosorbent assay (Ortho®
94 HTLV-1/HTLV-2 Ab-Capture ELISA Test Systems, Ortho-Clinical Diagnostic, Raritan,

95 USA), and reactive samples were retested by Western Blot (HTLV Blot 2.4, Genelabs
96 Diagnostics[®], Singapore). Test results were interpreted according to the stringent criteria
97 indicated by the manufacturer and in accordance with the guidelines established by the
98 Brazilian Ministry of Health (20).

99 The panel consisted of 397 samples: 200 HTLV-negative, 170 HTLV-positive (122
100 HTLV-1, 31 HTLV-2, 5 HTLV-1+HTLV-2, and 12 HTLV), and 27 WB-indeterminate.
101 Briefly, HTLV-negative samples were defined as those lacking reactivity to HTLV-specific
102 proteins; HTLV-1-positive samples were defined as reactive to GAG (p19 with or without
103 p24) and two ENV (GD21 and rgp46-I); HTLV-2-positive samples were reactive to GAG
104 (p24 with or without p19) and two ENV (GD21 and rgp46-II); HTLV seropositive samples
105 were reactive to GAG (p19 and p24) and ENV (GD21); samples were considered
106 indeterminate when no HTLV specific bands were detected, i.e. the criteria for HTLV-I,
107 HTLV-II or HTLV were not satisfied. Indeterminate samples were assessed by PCR analysis
108 and the obtained results were used to compare agreement with ELISA screening test results.
109 For performance analysis, the WB-indeterminate samples were excluded, forming a final
110 study panel of 370 samples (Fig. 1).

111 Alternatively, 217 plasma samples (112 positive, 105 negative) were also assessed by
112 chemiluminescence assay - CLIA (Architect rHTLV-1/2, Abbott Diagnostics Division,
113 Wiesbaden, Germany).

114 **Immunoassays.** Three HTLV1/2-specific enzyme immunoassay kits, all
115 commercially available in Brazil, were employed in this study: Murex HTLV-1/2 (DiaSorin
116 S.p.A., Dartford, UK), anti-HTLV-1/2 Sym Solution (Symbiosis Diagnostica LTDA, Leme,
117 Brazil) and Gold ELISA HTLV-1/2 (Rem Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brazil).
118 Cut-off values, as well as gray zones, were calculated for each test as follows: by adding 0.2

119 to the mean of the negative control replicates for Murex HTLV-1/2; adding 0.18 to the mean
120 of the negative control replicates for Anti-HTLV-1/2 Sym Solution; by adding 0.25 to the
121 mean of the negative control replicate for Gold ELISA HTLV-1/2. For data normalization,
122 all results were expressed by plotting values in an indexed format, calculated as the ratio
123 between a given sample's optical density (OD) and the cut-off OD values respective to each
124 assay. Under this index, referred to as a reactivity index (RI), all results <1.00 were
125 considered negative. When a sample's RI value was $1.0 \pm 10\%$, the result was considered as
126 indeterminate (i.e. in the grey zone), and these samples were deemed inconclusive.

127 **HTLV-1/2 molecular detection.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from
128 27 patients with WB-indeterminate results were obtained from EDTA blood samples under
129 density gradient centrifugation; DNA was extracted using a spin column kit (Qiagen, Hilden,
130 Germany). DNA samples were submitted to nested-PCR using the HTLV-1 long terminal
131 repeat (LTR) 5' region primers as described previously (25), outer primers BSQF6/BSDR3
132 and inner primers BSQF2/BSDR4, to amplify a 672-bp fragment in the HTLV-2 LTR region
133 (26). All amplified products were submitted to electrophoresis on a 1% agarose gel with
134 Syber Safe DNA (Invitrogen).

135 **Statistical analysis.** Data were encoded and analyzed using scatterplot computer
136 graphic software (Prism version 7; GraphPad, San Diego, CA). Descriptive statistics are
137 presented as geometric means \pm standard deviation. To test data normality, the Shapiro-Wilk
138 test, followed by Student's t-test, were used. When assumed homogeneity was not confirmed,
139 Wilcoxon's signed rank test was used. All analyses were two-tailed, and p-values under 5%
140 were considered significant ($p < 0.05$). Enzyme immunoassay test performance was
141 computed using a dichotomous approach and compared in terms of sensitivity, specificity,
142 accuracy, likelihood ratio (LR) and diagnostic odds ratio (DOR). Additionally, receiver

143 operating characteristic (ROC) curves were constructed and the areas under these curves
144 were used as a global measure of test performance. Confidence intervals (CI) were employed
145 at a confidence level of 95%. The strength of agreement between screening commercial tests
146 and PCR results was assessed by Cohen's Kappa coefficient (κ) (27), which accounts for
147 agreement occurring only by chance beyond simple percentage agreement calculations. κ
148 values are interpreted as poor ($\kappa \leq 0$), slight ($0 < \kappa \leq 0.20$), fair ($0.21 < \kappa \leq 0.40$), moderate
149 ($0.41 < \kappa \leq 0.60$), substantial ($0.61 < \kappa \leq 0.80$) and almost perfect agreement ($0.81 < \kappa \leq 1.0$).
150 A flowchart (Fig. 1) have been provided the Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy
151 Studies (STARD) guidelines (28).

152

153 RESULTS

154 **Assay performance.** Using plasma from 170 HTLV-positive individuals, ELISA and
155 CLIA performance were assessed, as shown in Fig. 2. The area under the curve (AUC) values
156 were >99%, demonstrating excellent overall diagnostic accuracy for all kits tested. RI values
157 for HTLV-1/2-positive samples were variable, ranging from 14.2 for SYM Solution, 14.5 for
158 Gold ELISA to 16.8 for Murex. In addition, Architect r-HTLV-1/2 yielded the highest RI
159 value (>90).

160 As all kits test demonstrated 100% sensitivity, no statistically significant differences
161 were detected. Regarding the HTLV-1/2-negative samples, SYM Solution and Gold ELISA
162 presented specificity values >99%. Architect r-HTLV-1/2 showed a specificity of 98.1%,
163 followed by Murex at 92.0%. Differences in specificity and RI were not statistically
164 significant between the SYM Solution and Gold ELISA kits. With respect to HTLV-negative
165 samples, the maximum RI value was obtained using Murex (RI = 0.30) (Fig. 2). Considering

166 RI values of 1.0 ± 0.10 as inconclusive, i.e. falling in the gray zone, we verified that truly
167 positive HTLV-1/2 samples were conclusively diagnosed by the Gold ELISA, Murex, SYM
168 Solution and Architect r-HTLV-1/2 tests. As regards the HTLV-negative samples, one fell
169 in the gray zone using the Gold ELISA test. With respect to diagnostic accuracy, Gold
170 ELISA, SYM Solution, and Architect rHTLV-1/2 tests demonstrated the highest accuracy
171 ($>99.1\%$), while Murex presented the lowest result (95.6%). DOR scores, based on likelihood
172 ratios, were 524,000 for Architect rHTLV-1/2, 338,200 for Gold ELISA, 168,254 for SYM
173 Solution and 19,552 for Murex HTLV-1/2. Among the ELISA kits evaluated, Gold ELISA
174 offered the best performance, as evidenced by ROC analysis and, notably, the exceptionally
175 high diagnostic odds ratio produced by this test (Fig. 2). No significant differences in RI
176 signal were observed with regard to the different types of seroreactivity (HTLV-1 vs. HTLV-
177 2 vs. HTLV-1/2 and HTLV).

178 **Assay agreement.** Analysis of the diagnostic accuracy of the three commercial
179 ELISAs with respect to 27 WB-indeterminate samples, considering PCR amplification as a
180 gold standard for HTLV diagnosis, revealed that eight samples were negative (29.6%) and
181 19 were positive (70.4%) for HTLV-1 (Fig. 3), with all ELISA tests yielding 100%
182 sensitivity. Conversely, all three assays presented specificity inferior to 25% , with Gold
183 ELISA offering just 12.5% specificity. Despite this very low accuracy, both Murex and SYM
184 Solution kits offered higher accuracy than Gold ELISA. Slight and fair agreement (Cohen's
185 Kappa < 0.40) between PCR analysis and the ELISA screening tests was detected with regard
186 to diagnosing HTLV infection. Table 1 details the 27 HTLV-indeterminate profiles that
187 allowed for the identification of distinct patterns. No HGIP (29) or N (30) patterns were
188 observed.

189

190 **DISCUSSION**

191 The present study found a high diagnostic value for each of the four different
192 evaluated commercially available HTLV screening tests used to detect anti-HTLV antibodies
193 in Brazil. In fact, AUC values greater than 99% demonstrates convincing evidence of the
194 optimal discriminative power of these kits regarding HTLV-positive and HTLV-negative
195 samples. Gold ELISA and Architect rHTLV-1/2 both presented AUC values of 100%.
196 Furthermore, the Murex, SYM Solution and Architect rHTLV-1/2 assays did not show
197 inconclusive results (grey zone) in HTLV antibody screening procedures. Gold ELISA
198 yielded low number of inconclusive results, as only one out of 170 HTLV-positive samples
199 tested using this kit produced an RI value that fell in the grey zone.

200 All tests displayed 100% sensitivity in diagnosing HTLV-positive samples. RI values
201 were higher than 14 for the ELISA tests and above 90 for the Architect rHTLV-1/2 kit, which
202 corroborates previous reports (31). Regarding the ELISA tests, the highest RI value was
203 achieved by Murex, with statistically significant differences seen compared to Gold ELISA
204 and SYM Solution.

205 Due to the high number of misdiagnosed samples (4.3%) under the Murex test, its
206 accuracy was significantly lower compared to the other kits. Gold ELISA, SYM Solution and
207 Architect rHTLV-1/2 were all found to be 99% accurate, suggesting that these kits can be
208 safely employed for HTLV infection screening. Although the Murex test is less accurate, it
209 nonetheless returned values above 95%, indicating suitability in the diagnosis of HTLV
210 infection; however, the proportion of samples requiring WB confirmation was greater, which
211 increases the cost of performing diagnosis. In fact, 8% of the HTLV-negative samples
212 assayed with Murex yielded false-positive results, with a specificity of 92%. It is interesting
213 to note that this test's performance has improved over time, as studies performed in 2007 and

214 2009 described its sensitivity and specificity at 98.2% and 42.6%, respectively (32, 33).
215 Another study conducted in Argentina showed that Murex was 97.2% sensitive and 99.7%
216 specific (34). More recently, other studies have reported high values of specificity, such as
217 those evaluating HIV/HTLV co-infected individuals (99.0%) (31) and blood donors (97.2%)
218 (34). With respect to HTLV-negative samples, the Murex test returned the highest RI value.
219 The observed differences in RI values could arise from variability in antigenic composition.
220 While all tests correctly diagnosed positive samples, it is possible that the antigenic matrix
221 employed in the solid phase of the Murex kit recognized no specific anti-HTLV antibodies,
222 which led to false-positive results or cross-reactions.

223 Of note, the sensitivity, specificity, and accuracy values associated with diagnostic
224 tests are unsatisfactory in terms of influencing clinical decisions (35). A diagnostic test can
225 only be considered valid if the results produced modify the probability of disease occurrence.
226 Likelihood Ratio (LR) measurements can be helpful in describing a test's discriminatory
227 power and determining the possibility of a particular result occurring among infected
228 individuals, as opposed to the probability of the same result being obtained among healthy
229 individuals (36). In our study, Gold ELISA had a positive LR of 201, indicating that an
230 HTLV-infected person is approximately 201 times more likely to be diagnosed with this
231 infection if evaluated with this kit. The lowest positive LR value was observed with the
232 Murex test (12.6), indicating a low probability for an HTLV-infected person to be accurately
233 diagnosed. Conversely, a study performed in 2008 found a positive LR of 326.5 for Murex
234 (34). HTLV-negative samples returned LR values lower than 0.001 under all of the evaluated
235 tests. There is a consensus that positive LRs above 10 and negative LRs below 0.1 contribute
236 substantially to diagnosis (36). DOR, calculated as the ratio between positive and negative
237 LR values, is considered a global performance parameter that summarizes the diagnostic test

238 accuracy. DOR values describe the probability of receiving a positive result for a person with
239 infection, as opposed to someone who is uninfected (35). The DOR for Architect rHTLV-1/2
240 (524,000) was the highest among the screening tests evaluated, followed by Gold ELISA
241 (338,200), SYM Solution (168,254) and Murex (19,552). These findings suggest that
242 Architect rHTLV-1/2 and Gold ELISA offer superior performance to SYM Solution and
243 Murex. LR and DOR determination are relevant and stable tools, since these parameters
244 remain independent of the prevalence of disease (37). The HTLV-1 and HTLV-2-
245 seroindeterminate WB patterns observed herein were similar to those reported by other
246 studies. However, no HGIP or N patterns were identified.

247 It is important to note that, concerning the Architect rHTLV-1/2 test, our findings are
248 in agreement with those reported by other studies. In fact, identical values of sensitivity
249 (100%) and specificity (>99%) have been described in both samples from blood donors and
250 hospitalized patients (38). Similar results were demonstrated by Malm et al. (39) (Sen 100%;
251 Spe 99.8%), as well as by Qiu et al. (40) (Sen 100%; Spe 99.98%) in general populations of
252 the USA, Japan and Nicaragua. Although the present study was unable to assess other
253 screening tests, the literature indicates the high performance of both the Elecsys HTLV-I/II
254 and Abbott Prism HTLV-I/HTLV-II kits (Sen 100%; Spe > 99%) in samples from both blood
255 donors and other obtained from a routine diagnostic service (41). The DiaSorin LIAISON®
256 XL recHTLV-I/II kit was also evaluated elsewhere, with high sensitivity and specificity
257 values reported, similarly to the Architect rHTLV-1/2 test (42–44).

258 The results presented herein indicate that all evaluated kits can safely be used for HTLV-
259 infection screening. However, it is important to note that the high sensitivity offered by these
260 kits may lead to false-positive results, which could increase cost as a result of WB
261 confirmation requirements. From the perspective of large diagnostic centers and blood banks,

262 proper screening method selection can substantially reduce costs associated with
263 confirmatory testing. In an effort to reduce costs and assure correct diagnosis, a new
264 diagnostic protocol for HTLV-infection diagnosis was proposed by Costa et al. (45), who
265 suggested the use of two ELISA tests for screening purposes, followed by real-time PCR. In
266 this case, WB confirmation would only be indicated in cases of negative PCR results. Herein,
267 when the 27 WB-indeterminate samples were analyzed by PCR, all HTLV-1 positive samples
268 demonstrated agreement with results from each of the three ELISA tests evaluated. On the
269 other hand, overall agreement was slight or fair due to the high number of false-positive
270 results obtained using ELISA. Moreover, it has been demonstrated that the INNO-LIA HTLV
271 I/II Ab serological confirmatory assay for HTLV yielded results for most of the samples
272 considered indeterminate or positive, but untypeable, in WB assays (31, 46). These data
273 suggest the costs associated with HTLV-infection diagnosis could be lowered by using
274 molecular biology-based methodologies, or INNO-LIA HTLV, as a confirmatory assay in
275 place of WB. In the context of low-income countries, such as those in Africa and Latin
276 America, we suggest that CLIA represents a suitable screening strategy for blood banks due
277 to the high DOR values found herein. However, in countries lacking the necessary
278 infrastructure, the use of an ELISA offering a high DOR value, e.g. Gold Elisa, seems to be
279 a satisfactory alternative.

280 Despite the scarcity of studies evaluating the diagnostic performance of screening tests in
281 diagnosing HTLV-infection by employing LR, DOR and AUC as performance parameters,
282 we evaluated three ELISA tests and one CLIA used for HTLV-infection screening. Based on
283 the present findings, we conclude that all of the 3rd generation commercially available kits
284 employed herein presented high sensitivity and specificity values compared to previous

285 studies. Among the ELISA tests evaluated, the Gold HTLV-1/2 kit offered the best
286 performance parameters, while the ARCHITECT rHTLV-1/2 demonstrated the highest
287 performance of all the assays considered. High sensitivity values produced by screening tests
288 could lead to high proportions of false-positive results. Thus, we reinforce our previous
289 suggestion and urge the consideration of a new protocol employing molecular biology or line
290 immune assay (INNO-LIA HTLV) techniques as a first choice for confirmatory testing in
291 place of WB.

292

293 **ACKNOWLEDGEMENTS**

294 We thank Andris K. Walter for providing English language revision and manuscript
295 copyediting assistance. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento
296 Científico e Tecnológico - CNPq (473667/2012-6 and 311054/2014-5), Fundação de Amparo
297 à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB (2574/2013), and Fundação Nacional para o
298 Desenvolvimento do Ensino Superior - FUNDAESP (9600113).

299

300 **Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

301 **REFERENCES**

- 302 1. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. 1980.
303 Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured
304 lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*
305 77:7415-7419. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC350514>.
- 306 2. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo
307 RC. 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with
308 a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218:571-573. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1126/science.6981847)
309 10.1126/science.6981847.
- 310 3. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A.
311 2005. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central
312 Africa. *Retrovirology* 2:30. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-30>.
- 313 4. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro
314 JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM,
315 Burke DS, Switzer WM. 2005. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses
316 among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7994-7999.
317 <https://doi.org/10.1073/pnas.0501734102>.
- 318 5. Gessain A, Cassar O. 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of
319 HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3:388.
320 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>.
- 321 6. Rafatpanah H, Hedayati-Moghaddam MR, Fathimoghdam F, Bidkhor HR,
322 Shamsian SK, Ahmadi S, Sohgandi L, Azarpazhooh MR, Rezaee SA, Farid R,
323 Bazarbachi A. 2011. High prevalence of HTLV-I infection in Mashhad, Northeast
324 Iran: a population-based seroepidemiology survey. *J Clin Virol* 52:172-176.

- 325 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.004>.
- 326 7. Einsiedel L, Purcell D, Schinke S, Haynes K, Taylor GP, Martin F. 2018. Highlights
327 from the HTLV-I symposium at the 2017 Australasian HIV and AIDS Conference
328 held jointly with the 2017 Australasian Sexual Health Conference, November 2017,
329 Canberra, Australia. *J virus Erad* 4:48-50.
330 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5851185>.
- 331 8. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. 1982. Isolation and characterization of retrovirus
332 from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease.
333 *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2031-2035. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.2031>.
- 334 9. Gessain A, Vernant JC, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender A, De Thé G. 1985.
335 Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic
336 paraparesis. *Lancet* 326:407-410. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)92734-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(85)92734-5).
- 337 10. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M.
338 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1:1031-1032.
339 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91298-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91298-5).
- 340 11. LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. 1990. Infective
341 dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336:1345-
342 1347. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92896-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92896-P).
- 343 12. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M,
344 Araki S, Takatsuki K, Mori S, Miyata N. 1992. Uveitis associated with human T-cell
345 lymphotropic virus type I. *Am J Ophthalmol* 114:123-129.
346 [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)73974-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)73974-1).
- 347 13. Castro-Lima Vargens C, Grassi MFR, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria
348 VN, de Almeida Kruschewsky R, Galvão-Castro B. 2011. Keratoconjunctivitis sicca

- 349 of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is
350 associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *J Clin Virol* 52:177-180.
351 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.07.016>.
- 352 14. Einsiedel L, Pham H, Wilson K, Walley R, Turpin J, Bangham C, Gessain A,
353 Woodman RJ. 2018. Human T-Lymphotropic Virus type 1c subtype proviral loads,
354 chronic lung disease and survival in a prospective cohort of Indigenous Australians.
355 *PLoS Negl Trop Dis* 12:e0006281. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006281>.
- 356 15. Araujo A, Hall WW. 2004. Human T-lymphotropic virus type II and neurological
357 disease. *Ann Neurol* 56:10-19. <https://doi.org/10.1002/ana.20126>.
- 358 16. Mauclère P, Afonso PV, Meertens L, Plancoûlaine S, Calattini S, Froment A, Van
359 Beveren M, de Thé G, Quintana-Murci L, Mahieux R, Gessain A. 2011. HTLV-2B
360 strains, similar to those found in several Amerindian tribes, are endemic in central
361 African Bakola Pygmies. *J Infect Dis* 203:1316-1323.
362 <https://doi.org/10.1093/infdis/jir031>.
- 363 17. Paiva A, Casseb J. 2015. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type
364 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas.
365 *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57:1-13. [https://doi.org/10.1590/S0036-](https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100001)
366 [46652015000100001](https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100001).
- 367 18. Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco
368 LG, Muller M, Sampaio DA, Santana A, Passos LM, Proietti F. 1997. Distribution of
369 human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian
370 study. *Transfusion* 37:242-243. [https://doi.org/10.1046/j.1537-](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x)
371 [2995.1997.37297203532.x](https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x).
- 372 19. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB de F, Proietti FA, Interdisciplinary HTLV

- 373 Research Group. 2005. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell
374 lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in
375 blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saude Publica* 21:926-931.
376 <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000300027>.
- 377 20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional
378 de DST e Aids. 2003. Guia do manejo clínico do HTLV / Ministério da Saúde,
379 Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids, p. 41. *In*
380 Ministério da Saúde, Brasília. Available from:
381 http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_manejo_clinico_do_paciente_co
382 [m_HTLV.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_manejo_clinico_do_paciente_co_m_HTLV.pdf).
- 383 21. Hartley TM, Malone GE, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. 1991. Evaluation of a
384 recombinant human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p21E antibody
385 detection enzyme immunoassay as a supplementary test in HTLV-I/II antibody
386 testing algorithms. *J Clin Microbiol* 29:1125-1127.
387 <https://jcm.asm.org/content/29/6/1125.long>.
- 388 22. Soriano V, Gutiérrez M, Tuset C, Martínez-Zapico R, Calderón E, González-Lahoz
389 J. 1995. Avoiding false-negative results for HTLV-II using new serological assays.
390 *Am J Med* 98:103. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)80095-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)80095-3).
- 391 23. Andersson S, Thorstensson R, Ramirez KG, Krook A, von Sydow M, Dias F,
392 Biberfeld G. 1999. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of
393 antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera
394 from Sweden and West Africa. *Transfusion* 39:845-851.
395 <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39080845.x>.
- 396 24. Caterino-de-Araujo A. 2009. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell

- 397 lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods* 156:150-151.
398 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.10.003>.
- 399 25. Mboudjeka I, Zekeng L, Yamashita M, Takehisa J, Ido E, Miura T, Ohkura S, Ikeda
400 M, Kaptue L, Hayami M. 1997. Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-I
401 isolates in Cameroon, including those of the Baka Pygmy. *Jpn J Cancer Res* 88:619-
402 624. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1997.tb00427.x>.
- 403 26. Alcantara LCJ, Shindo N, Van Dooren S, Salemi M, Costa MCR, Kashima S, Covas
404 DT, Vandamme A-M, Galvão-Castro B. 2003. Brazilian HTLV type 2a strains from
405 intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian
406 Amerindians and European/North American IDUs. *AIDS Res Hum Retroviruses*
407 19:519-523. <https://doi.org/10.1089/088922203766774577>.
- 408 27. Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical
409 data. *Biometrics* 33:159-174. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843571>.
- 410 28. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, Lijmer JG,
411 Moher D, Rennie D, de Vet HCW, Kressel HY, Rifai N, Golub RM, Altman DG,
412 Hooft L, Korevaar DA, Cohen JF. 2015. STARD 2015: an updated list of essential
413 items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* h5527.
414 <https://doi.org/10.1136/bmj.h5527>.
- 415 29. Rouet F, Meertens L, Courouble G, Herrmann-Storck C, Pabingui R, Chancerel B,
416 Abid A, Strobel M, Mauclere P, Gessain A. 2001. Serological, epidemiological, and
417 molecular differences between human T-cell lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1)-
418 seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate Western
419 blot patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol* 39:1247-1253.
420 <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1247-1253.2001>.

- 421 30. Filippone C, Bassot S, Betsem E, Tortevoye P, Guillotte M, Mercereau-Puijalon O,
422 Plancoulaine S, Calattini S, Gessain A. 2012. A new and frequent human T-cell
423 leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and
424 PCR results in central African inhabitants. *J Clin Microbiol* 50:1663-1672.
425 <https://doi.org/10.1128/JCM.06540-11>.
- 426 31. Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Caterino-de-Araujo A. 2017. Comparative
427 performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic
428 virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with human
429 immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Braz J Infect Dis* 21:297-305.
430 <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.02.005>.
- 431 32. Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. 2009.
432 Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme
433 immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in “at-risk” individuals from
434 São Paulo, Brazil. *J Virol Methods* 159:288-290.
435 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.03.024>.
- 436 33. Jacob F, Santos-Fortuna E de los, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. 2007.
437 Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk
438 population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49:361-364.
439 <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000600005>.
- 440 34. Berini CA, Susana Pascuccio M, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodriguez C,
441 Pando MA, Biglione MM. 2008. Comparison of four commercial screening assays
442 for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. *J Virol Methods*
443 147:322-327. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.09.012>.
- 444 35. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bonsel GJ, Bossuyt PMM. 2003. The diagnostic

- 445 odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 56:1129-1135.
446 [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(03\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(03)00177-X).
- 447 36. Sackett DL, Straus S. 1998. On some clinically useful measures of the accuracy of
448 diagnostic tests. *ACP J Club* 129:A17-19. [https://doi.org/10.7326/ACPJC-1998-129-](https://doi.org/10.7326/ACPJC-1998-129-2-A17)
449 [2-A17](https://doi.org/10.7326/ACPJC-1998-129-2-A17).
- 450 37. Santos FL, Celedon PA, Zanchin NI, Souza WV, Silva ED, Foti L, Krieger MA,
451 Gomes Y de M. 2017. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of
452 chronic Chagas disease - a Phase II study. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005433.
453 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005433>.
- 454 38. Kapprell H-P, Stieler M, Oer M, Goller A, Hausmann M, Schochetman G, Devare
455 SG, Qiu X. 2010. Evaluation of a new third-generation ARCHITECT rHTLV-I/II
456 assay for blood screening and diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67:61-69.
457 <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.021>.
- 458 39. Malm K, Kjerstadius T, Andersson S. 2010. Evaluation of a new screening assay for
459 HTLV-1 and -2 antibodies for large-scale use. *J Med Virol* 82:1606-1611.
460 <https://doi.org/10.1002/jmv.21867>.
- 461 40. Qiu X, Hodges S, Lukaszewska T, Hino S, Arai H, Yamaguchi J, Swanson P,
462 Schochetman G, Devare SG. 2008. Evaluation of a new, fully automated
463 immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies. *J Med Virol*
464 80:484-493. <https://doi.org/10.1002/jmv.21083>.
- 465 41. Laperche S, Sauleda S, Piron M, Mühlbacher A, Schennach H, Schottstedt V,
466 Queirós L, Uno N, Yanagihara K, Imdahl R, Hey A, Klinkicht M, Melchior W,
467 Muench P, Watanabe T. 2017. Evaluation of Sensitivity and Specificity Performance
468 of Elecsys HTLV-I/II Assay in a Multicenter Study in Europe and Japan. *J Clin*

- 469 Microbiol 55:2180-2187. <https://doi.org/10.1128/JCM.00169-17>.
- 470 42. Malm K, Kragstbjerg E, Andersson S. 2015. Performance of Liaison XL automated
471 immunoassay platform for blood-borne infection screening on hepatitis B, hepatitis
472 C, HIV 1/2, HTLV 1/2 and *Treponema pallidum* serological markers. *Transfus Med*
473 25:101-105. <https://doi.org/10.1111/tme>.
- 474 43. Gantner P, Velay A, Guigue N, Barth H, Wendling M-J, Delaugerre C, Fafi-Kremer
475 S. 2017. Performance of the Liaison® XL Murex recHTLV-I/II Immunoassay in the
476 Detection of HTLV-1/2 Antibodies in Serum. *Clin Lab* 63:997-1001.
477 <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.161026>.
- 478 44. Ly TD, Coignard C. 2016. Performance of the LIAISON® XL murex recHTLV-I/II
479 assay. *J Clin Virol* 82:S88-S89. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.08.176>.
- 480 45. Costa EAS, Magri MC, Caterino-de-Araujo A. 2011. The best algorithm to confirm
481 the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil.
482 *J Virol Methods* 173:280-286. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.018>.
- 483 46. Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Sáez-Alquézar
484 A. 1999. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human
485 T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *J Clin Microbiol*
486 37:1324-1328. <https://jcm.asm.org/content/37/5/1324.long>.

487

488 **Fig 1 Flowchart depicting study design in accordance with the Standards for Reporting**
489 **of Diagnostic Accuracy studies (STARD) guidelines.**

490

491 **Fig 2 Reactivity index of screening assays obtained in positive (red dots) and negative**
492 **(blue dots) plasma samples under HTLV-1/2 WB analysis. The cut-off value was IR = 1.0**

493 and the area delimited by lines represents the indeterminate zone ($RI \pm 10\%$). Numbers
494 shown for each group are representative of geometric means ($\pm 95\%$ CI); AUC (Area Under
495 Curve); Sen (Sensitivity); Spe (Specificity); Acc (Accuracy); LR (Likelihood Ratio); DOR
496 (Diagnostic Odds Ratio).

497

498 **Fig 3 Analysis of WB-indeterminate samples using PCR as a gold standard.** Acc
499 (accuracy); CI (confidence interval); κ (Cohen's Kappa coefficient); PCR (polymerase chain
500 reaction); Sen (sensitivity); Spe (specificity).

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517 TABLE 1. Indeterminate HTLV patterns in samples from Brazil

WB Pattern	<i>n</i> (%)	Gold ^b	Murex ^c	SYM ^d
gd21 alone	7 (25.9)	7/7	6/7	6/7
gd21+p19	7 (25.9)	7/7	7/7	7/7
gd21+synthetic peptides (46I or 46II)	5 (18.5)	4/5	4/5	4/5
Others ^a	8 (29.7)	8/8	8/8	8/8
HGIP (29)	0	-	-	-
N (30)	0	-	-	-
Total	27 (100)	26/27	25/27	25/27

518 ^aOne band each for gd21 plus p19 plus p28, gd21 plus p19 plus p26 plus p28 plus p32, gd21
519 plus p19 plus p28 plus p36, gd21 plus p19 plus p26 plus p28 plus p36, plus gd21 plus p19
520 plus p26 plus p28 plus p32 plus p36, p19 plus p21 plus p26 plus p28 plus p32 plus p36 plus
521 MTA-1 plus pr53, p19 plus p26 plus p28, synthetic peptide 46II alone

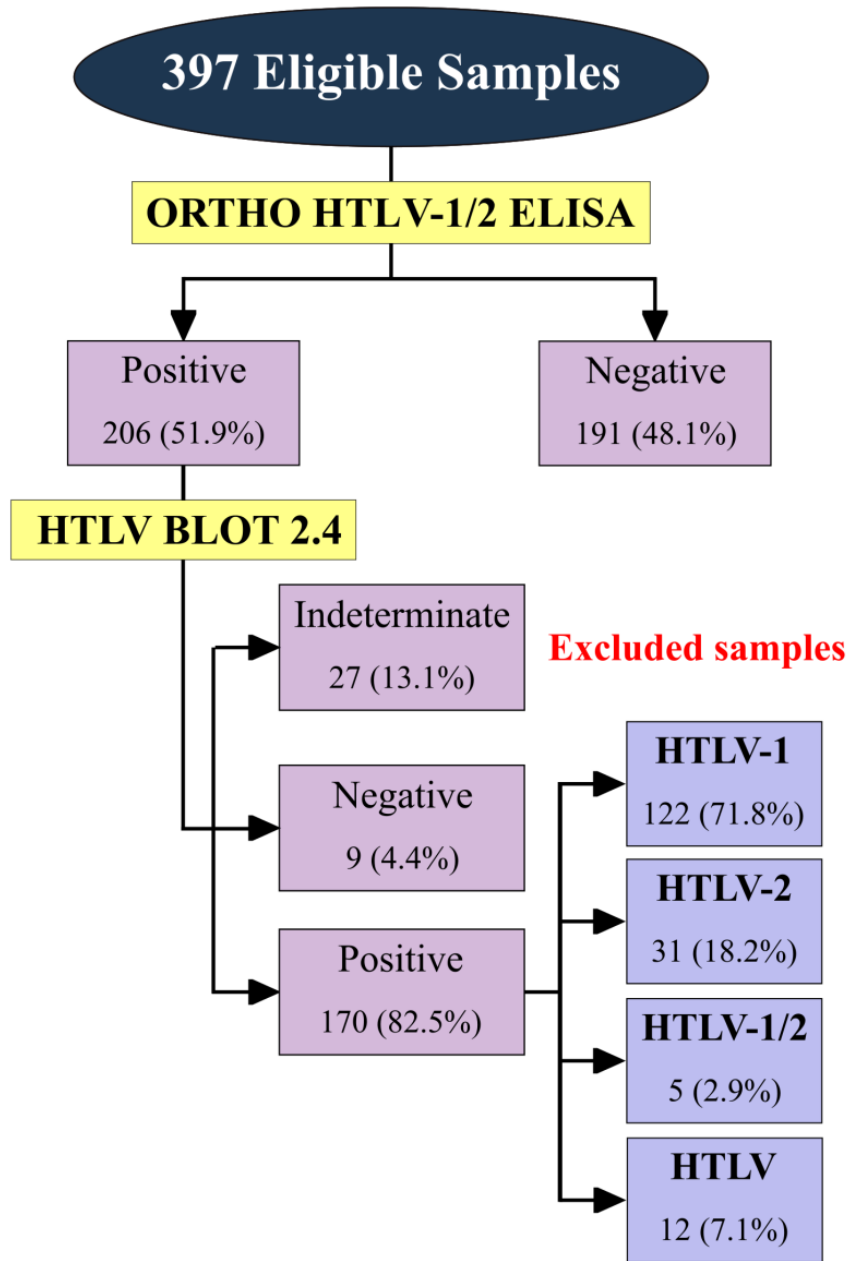
522 ^bGold ELISA HTLV-1/2 (Rem Indústria e Comércio LTDA, São Paulo, Brazil);

523 ^cMurex HTLV-1/2 (DiaSorin S.p.A., Dartford, UK);

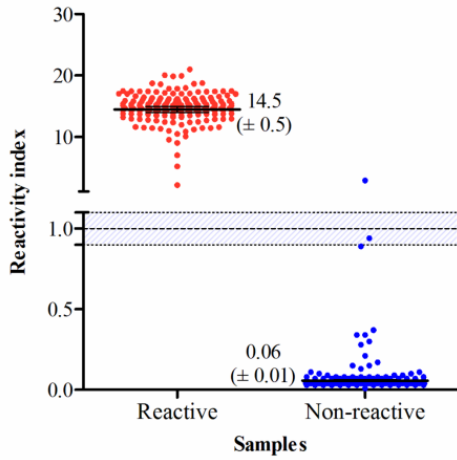
524 ^dAnti-HTLV-1/2 Sym Solution (Symbiosis Diagnostica LTDA, Leme, Brazil)

525

Study design to evaluate the performance of commercial HTLV screening tests



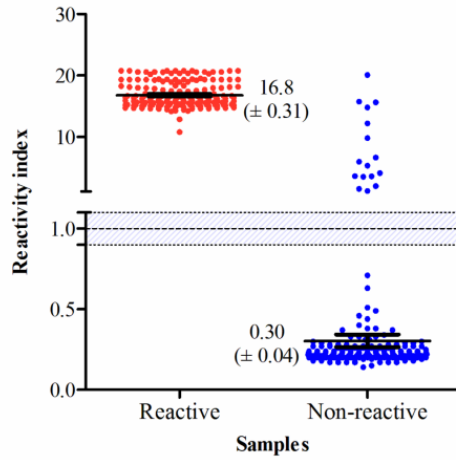
GOLD ELISA HTLV-1/2



AUC: 1.0000
 Sen (%): 100 (97.8-100)
 Spe (%): 99.5 (97.2-99.9)
 Acc (%): 99.7 (98.5-100)

LR+: 201
 LR-: 0.001
 DOR: 338,200

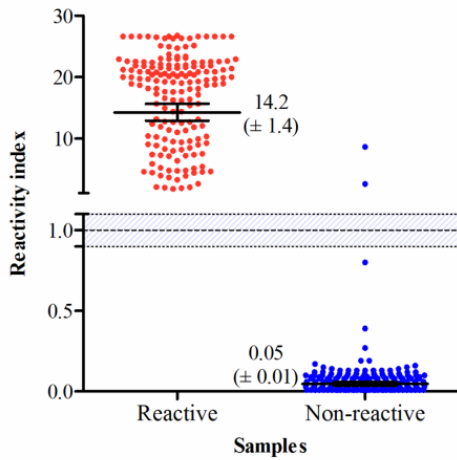
MUREX HTLV-1/2



AUC: 0.9915 (± 0.0098)
 Sen (%): 100 (97.8-100)
 Spe (%): 92.0 (87.5-95.0)
 Acc (%): 95.7 (93.1-97.3)

LR+: 12.6
 LR-: 0.001
 DOR: 19,552

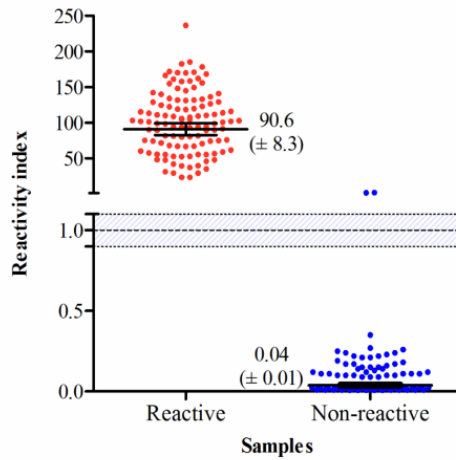
ANTI-HTLV-1/2 SYM SOLUTION



AUC: 0.9989 (± 0.0021)
 Sen (%): 100 (97.8-100)
 Spe (%): 99.0 (96.4-99.7)
 Acc (%): 99.5 (98.1-99.9)

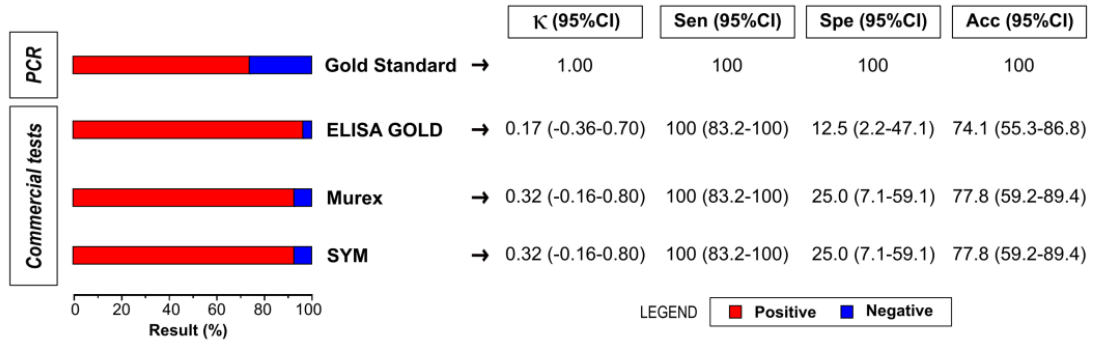
LR+: 100.4
 LR-: 0.001
 DOR: 168,254

ARCHITECT rHTLV-1/2



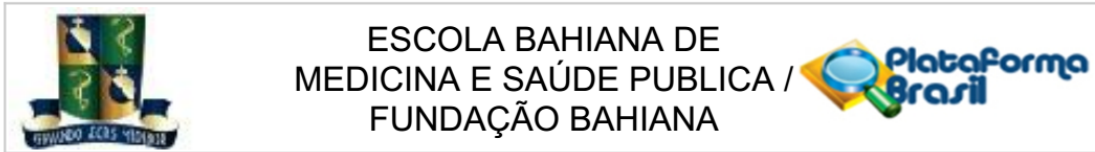
AUC: 1.0000
 Sen (%): 100 (96.7-100)
 Spe (%): 98.1 (93.3-99.5)
 Acc (%): 99.1 (96.7-99.7)

LR+: 52.4
 LR-: 0.0001
 DOR: 524,000



ANEXO

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



ESCOLA BAHIANA DE
MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA /
FUNDAÇÃO BAHIANA

Plataforma
Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aprimoramento do diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e avaliação da carga proviral como biomarcador de evolução da HAM/TSP: comparação de ensaios de diagnósticos, padronização da detecção da carga proviral e análise da indeterminação diagnóstica

Pesquisador: Bernardo Galvão Castro Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11594513.3.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 464.286

Data da Relatoria: 30/10/2013

Apresentação do Projeto:

As infecções pelos HTLV-1/2 estão disseminadas em todas as regiões do Brasil, porém esta distribuição é heterogênea, observando-se taxas mais elevadas no Norte e Nordeste. Estima-se que o Brasil tenha o maior número absoluto (2 milhões) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 no mundo.

Este vírus causa a leucemia/linfoma de células T do adulto, a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH), uveíte associada ao HTLV-1, dermatite infectiva e alterações imunológicas. Há poucas evidências da associação do HTLV-2 com doença. O diagnóstico laboratorial do HTLV-1/2 é feito com testes de triagem (ELISA) e confirmatórios (Western Blot, PCR). Porém em alguns casos, o diagnóstico é indeterminado pela técnica de WB e a técnica de PCR ainda não foi padronizada para uso em larga escala. Levando-se isto em consideração, propusemos contribuir para o

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

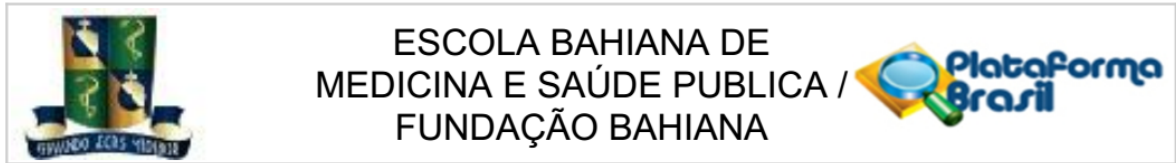
UF: BA

Telefone: (71)3276-8225

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

aprimoramento

do diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e avaliar se carga proviral é um biomarcador de evolução da HAM/TSP, com isso, pretendemos comparar a sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e negativo de testes de diagnóstico laboratoriais (ELISA e WB) disponíveis no mercado nacional. Além de padronizar a detecção da carga proviral e analisar as possíveis indeterminações diagnósticas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Contribuir para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e avaliar a carga proviral como biomarcador de evolução da HAM/TSP.

Objetivos Secundários:

- 1) Comparar a sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e negativo de testes de diagnóstico laboratorial (ELISA e WB) disponíveis no mercado nacional;
- 2) Padronizar a técnica da detecção da carga proviral (CPV) ;
- 3) Analisar as causas da indeterminação diagnóstica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O pesquisador informa que não haverá nenhum risco para os pacientes porque as amostras a serem testadas já estão disponíveis no biobanco do Centro HTLV. As amostras a serem utilizadas são constituídas por células mononucleares do sangue periférico, plasma e soros de 100 indivíduos infectados pelo HTLV-1. O sangue periférico foi coletado, por punção venosa da veia cubital. Os soros/plasma e as amostras de DNA constituíram um painel de soros e de DNA que serão testados anonimamente. O sigilo em relação aos pacientes será guardado.

Benefícios:

O elevado custo dos kits para detecção da infecção pelo HTLV-1/2 muitas vezes inviabiliza a

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

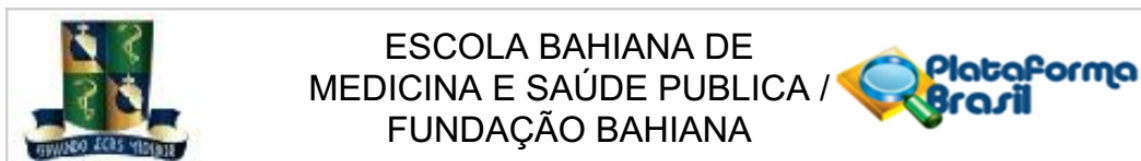
Bairro: BROTAS

UF: BA **Município:** SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

detecção

destes vírus em populações de risco impedindo uma sistematização da vigilância epidemiológica. A falta desta vigilância contribui para a disseminação da infecção principalmente por via perinatal desde que a triagem perinatal não é mandatória no Brasil com exceção de Minas Gerais. O diagnóstico da infecção pelo HTLV é complexo. Esta complexidade é agravada no Brasil devido a que não existe uma norma clara e precisa do Ministério da Saúde indicando um fluxograma para o diagnóstico da infecção, o que resulta na indefinição sobre do status infeccioso do indivíduo. A ausência desta diretriz desobriga os laboratórios e bancos de sangue de realizar os testes confirmatórios que definem o diagnóstico laboratorial definitivo da infecção. Portanto, deixando dúvidas em relação a um caso suspeito o que resulta graves danos no seu bem estar físico e

mental impactando negativamente na sua qualidade de vida. Além disso não permite que estes indivíduos sejam acompanhados clinicamente o que resultará graves consequências na saúde dos mesmos. Em resumo, o conhecimento do status de portador permite o adequado aconselhamento evitando a transmissão da infecção. Além disso, o melhor entendimento da indeterminação sorológica poderá contribuir para a manufatura de testes nacionais mais sensíveis e específicos para a população brasileira. Desta forma, evitase

o dispendioso custo para o esclarecimento do diagnóstico laboratorial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para alcançar os objetivos, o pesquisador informa que utilizará as seguintes estratégias e metodologias:

Objetivo 1: será determinada a capacidade dos ELISAs em identificar casos suspeitos de infecção por HTLV

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

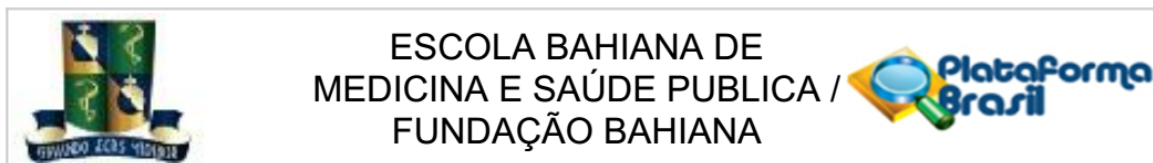
UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

-1 e HTLV-2;

Objetivo 2: nesta etapa serão comparadas as técnicas TaqMan e SBYER Green, avaliadas a sensibilidade e especificidade das técnicas de detecção de CPV utilizando as regiões tax e pol e analisadas a sensibilidade das técnicas a partir de sangue total e PBMC. O sangue periférico, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC);

Objetivo 3: nesta etapa serão sequenciadas as regiões gênicas codificantes das proteínas gp46, gp21, p19, p24 e p12 (HTLV-1) provenientes de indivíduos soro indeterminados, positivos, não tipados, e com resultado falso-positivo para coinfeção HTLV-1/HTLV-2 no WB, o que permitirá a identificação de mutações no genoma proviral que codifica as proteínas referidas. Estas proteínas serão também caracterizadas quanto ao perfil físico-químico, à apresentação de epítomos alelo-específico, assinaturas proteicas, e síntese de RNA. Serão feitas comparações de valores da CPV nos diferentes grupos de indivíduos envolvidos nesta etapa de estudo. Verificar-se-á também se existe uma associação entre a frequência dos alelos da p12 e a CPV, como também com as manifestações clínicas e o perfil sorológico;

Diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2: de todas as amostras, (positivas para o HTLV-1 e HTLV- 2, indeterminadas, não tipadas, HTLV-1/2 e as provenientes de indivíduos com coinfeção (HTLV-1 e HTLV-2), foi extraído o DNA a partir de sangue total, utilizando o QIAGEN QIAamp® DNA Blood Kit. O DNA foi submetido a duas nested-PCR para a região LTR e uma nested-PCR para o gene pol, para confirmar a infecção pelo HTLV-1 nos indivíduos com resultado inconclusivo no WB. Dois fragmentos complementares para a região LTR foram amplificados: o fragmento LTR-gag com 473 pb e o fragmento tax-LTR a uma eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio e

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

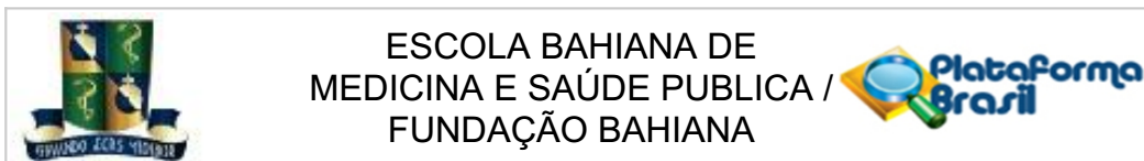
UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

visualizados sob luz

ultravioleta;

Os pacientes com perfil de WB indeterminado e não tipado, no W.Blot e com infecção confirmada por detecção molecular, serão convocados para uma nova coleta de sangue

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados de forma satisfatória.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sanadas as pendências anteriormente assinaladas, projeto exequível que atende à REs. 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

É da responsabilidade do pesquisador responsável o encaminhamento dos relatórios parciais /final. O não cumprimento implicará na não apreciação de novos projetos deste pesquisador.

SALVADOR, 22 de Novembro de 2013

**Assinador por:
Roseny Ferreira
(Coordenador)**

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br