

Artigo de revisão

Diagnóstico molecular de vírus T-linfotrópico humano (HTLV): histórico e estado da arte*

Molecular diagnosis of human T-lymphotropic virus (HTLV): history and state of the art

Adele Caterino-de-Araujo¹; Maria Gisele Gonçalves¹

¹Centro de Imunologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil.

RESUMO

Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (*nucleic acid amplification techniques*, NAATs) que pesquisam partes do genoma proviral de vírus T-linfotrópicos humanos (*human T-lymphotropic virus*, HTLVs) são importantes ferramentas para a caracterização molecular, diagnóstico e quantificação de carga proviral. No Brasil, os HTLV-1 e HTLV-2 são endêmicos, e o diagnóstico diferencial entre eles é de suma importância, uma vez que o HTLV-1 está relacionado a doenças graves como a mielopatia associada ao HTLV-1 e a leucemia/linfoma de células T adultas, enquanto o HTLV-2 parece não ser patogênico. Este trabalho realiza uma revisão narrativa das NAATs utilizadas ao longo dos anos na pesquisa de HTLVs; apresenta um quadro com dados de autor/ano de publicação, local de realização do trabalho, técnica empregada, genes alvo e objetivo do estudo. Outrossim, relata causas de possíveis falhas no diagnóstico molecular; apresenta novas metodologias e pesquisas sobre técnicas que mais se adequam à realidade brasileira; esclarece sobre a necessidade de se implantar o diagnóstico molecular na rede pública

*Derivação: Artigo derivado em parte da tese de doutorado intitulada "Padronização e validação da PCR em tempo real para a detecção rápida e quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2", defendida por Maria Gisele Gonçalves junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências/Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, em 29 de maio de 2019.

de saúde, tomando como base seu melhor custo-benefício para laboratórios que dispõem de infraestrutura e pessoal capacitado. Concluindo, fornece informações úteis para a implementação de políticas públicas de saúde dentro do âmbito do SUS, uma vez que a infecção por HTLV-1 vem ganhando notoriedade junto ao Ministério da Saúde do Brasil e a Organização Mundial da Saúde, por ser de alta prevalência em várias partes do mundo, estar associada a doenças de alta morbidade e letalidade, carecer de cura, e só ser controlada com medidas de prevenção da infecção que dependem do diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE: vírus T-linfotrópico humano (HTLV); vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1); vírus T-linfotrópico 2 (HTLV-2); Diagnóstico; Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT); Reação em cadeia da polimerase (PCR).

ABSTRACT

Nucleic acid amplification techniques (NAATs) that search for segments of the proviral genome of human T-lymphotropic viruses (HTLVs) are important tools for molecular characterization, diagnosis, and proviral load quantification. In Brazil, HTLV-1 and HTLV-2 are endemic, and the differential diagnosis between them is very important since HTLV-1 is related to severe diseases such as HTLV-1-associated myelopathy and adult T-cell leukemia/lymphoma, while HTLV-2 appears to be non-pathogenic. This narrative review describes the NAATs used over the years in HTLV diagnosis; presents a table with data on author/year of publication, place of work, technique used, target genes, and the objective of the study. It reports the causes of possible failures in molecular diagnosis;

presents new methodologies and research on techniques that best fit the Brazilian laboratory conditions and supplies. It clarifies the need to implement HTLV molecular diagnosis in the public health network, based on its best cost-benefit ratio for laboratories that have infrastructure and trained personnel. In conclusion, it provides useful information for the implementation of public health policies within the scope of the unified system of health (Sistema Único de Saúde, SUS), since HTLV-1 infection has been gaining notoriety with the Ministry of Health of Brazil and the World Health Organization, as it is highly prevalent in various parts of the world, it is associated with diseases of high morbidity and mortality, has no cure, and can only be controlled with infection prevention measures that depend on the diagnosis.

KEYWORDS: human T-lymphotropic virus (HTLV); human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1); human T-lymphotropic virus 2 (HTLV-2); Diagnosis; Nucleic acid amplification techniques (NAAT); Polymerase chain reaction (PCR).

Apresentação

O diagnóstico laboratorial de infecção pelos vírus T-linfotrópicos humanos 1 e 2 (*human T-lymphotropic virus 1 and 2*, HTLV-1 e HTLV-2) se baseia na triagem sorológica para pesquisa de anticorpos específicos presentes em fluidos biológicos como sangue e líquido cefalorraquidiano, utilizando ensaio imunoenzimático (*enzyme immunoassay*, EIA) ou de quimioluminescência (*chemiluminescence immunoassay*, CLIA), seguido pelo teste complementar (confirmatório e discriminatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2) de *Western blotting* (WB) ou imunoensaio de linha (*line immunoassay*, LIA).¹ No entanto, o WB (mais utilizado no Brasil) apresenta altos percentuais de resultados

inconclusivos (HTLV não tipados ou indeterminados), principalmente em casos de coinfeções pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite B (*hepatitis B virus*, HBV) e vírus da hepatite C (*hepatitis C virus*, HCV), além de ter alto custo.²⁻⁵ Recentemente, o LIA foi apontado como uma alternativa ao WB, por apresentar maior sensibilidade, tanto para casos de monoinfecção por HTLV-1 como para casos de coinfeções;^{5,6} porém, este ensaio também é considerado de alto custo.

Uma opção para o diagnóstico confirmatório de HTLV-1 e HTLV-2 consiste em técnicas moleculares que pesquisam segmentos do genoma proviral desses vírus presentes em células mononucleares do sangue periférico e de outros fluidos biológicos, utilizando técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (*nucleic acid amplification techniques*, NAATs), em seus mais variados formatos. As NAATs podem ser utilizadas também para a caracterização molecular, como para o monitoramento de carga viral.

O presente trabalho propõe-se a apresentar uma revisão narrativa sobre as técnicas moleculares usadas no diagnóstico de HTLVs ao longo dos anos, desde as mais simples até as de última geração, contextualizando seu emprego, critérios de positividade e resultados obtidos, apontando possíveis causas de resultados falso-negativos, e chamando a atenção para as técnicas de melhor custo-benefício advindas de pesquisas recentes conduzidas no Brasil e que se adequam às diferentes infraestruturas laboratoriais e aos insumos disponíveis no comércio.

Histórico

Os HTLVs pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*.⁷ São vírus RNA que possuem a enzima

transcriptase reversa (TR), capaz de converter seu RNA em DNA complementar, e nesta forma, inserir-se no DNA da célula hospedeira, caracterizando o que é conhecido como provírus.

Até o momento foram descritos quatro tipos de HTLV: os dois primeiros, HTLV-1 e HTLV-2, foram descritos nos anos de 1980 e 1982 respectivamente, sendo que o HTLV-1 foi isolado de células do sangue periférico de pacientes com linfoma cutâneo de células T,⁸ e o HTLV-2, de células de baço de um paciente com tricoleucemia de células T.⁹ Estes vírus receberam a denominação de vírus linfotrópicos de células T humanas (atualmente vírus T-linfotrópicos humanos) por infectarem predominantemente, mas não exclusivamente, os linfócitos T, dado que o HTLV-1 infecta preferencialmente os linfócitos T CD4+,¹⁰ enquanto o HTLV-2, os linfócitos T CD8+.¹¹ São endêmicos em populações de várias regiões geográficas, e diferem quanto à patogenicidade: o HTLV-1 é responsável por doenças de alta morbidade e letalidade, como a mielopatia associada ao HTLV-1 ou paraparesia espástica tropical (*HTLV-1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis, HAM/TSP*) e a leucemia/linfoma de células T adultas (*adult T-cell leukemia/lymphoma, ATL*), já o HTLV-2 parece não ser patogênico.¹² Ademais, apresentam distribuição geográfica distinta: o HTLV-1 é endêmico no sudoeste do Japão, certas regiões do Caribe, América do Sul (destacando o Brasil), região intertropical da África e Oriente Médio, além de algumas ilhas da Melanésia,¹² enquanto o HTLV-2 é endêmico em populações nativas, como indígenas das Américas e tribos de Pigmeus na África, e em usuários de drogas injetáveis de regiões urbanas.¹³

Em 2005, foram descritos o HTLV-3 e o HTLV-4 em indivíduos assintomáticos (caçadores) de Camarões, na África Central. Estes tipos virais não têm importância clínico-epidemiológica, não

havendo até o momento descrição de doença, tampouco de regiões e populações endêmicas.^{14,15}

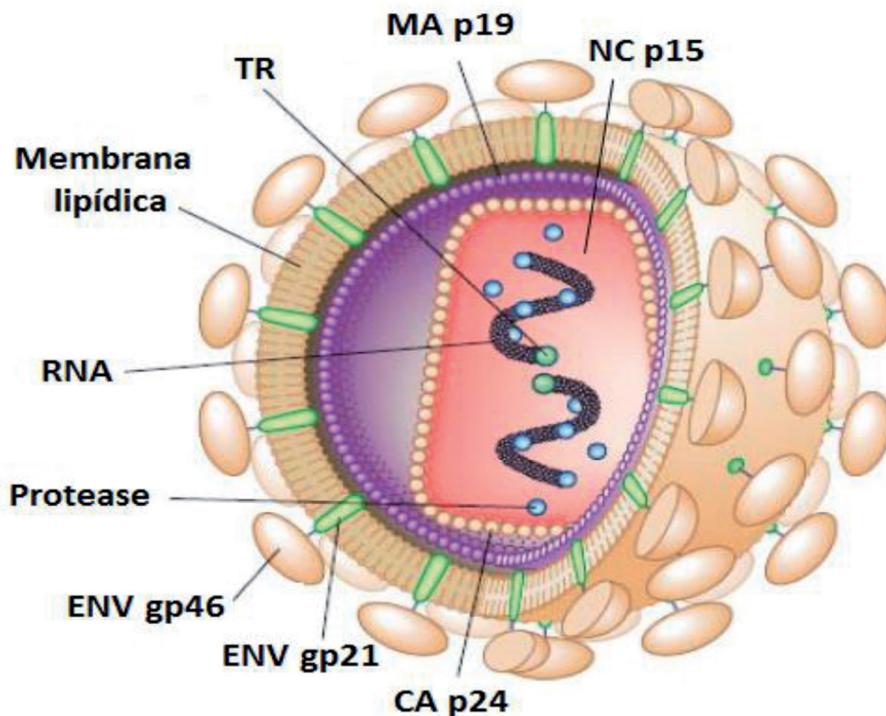
Epidemiologia no Brasil

Estima-se que o Brasil seja o país com o maior número absoluto de infectados por HTLVs no mundo. É um país endêmico tanto para a infecção por HTLV-1 como para HTLV-2, no entanto, os dados de prevalência na população geral são escassos, e as informações existentes referem-se a algumas populações e regiões geográficas. Segundo dados de 2020 que constam do Boletim Epidemiológico sobre HTLV do Ministério da Saúde, há entre 800.000 e 2,5 milhões de pessoas vivendo com HTLV no Brasil, com prevalências que variam de acordo com a região geográfica, grupo étnico, nível socioeconômico e categorias de risco para adquirir a infecção.¹⁶ Por exemplo, na população geral de Salvador, Bahia, foi encontrada prevalência de 1,48%; em doadores de sangue de todo o país as prevalências variaram entre 0,03% e 0,48%, e em gestantes entre 0 e 1,05%. No geral, as maiores prevalências foram encontradas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, e as menores prevalências na região Sul. Em populações vulneráveis (usuários de drogas ilícitas injetáveis, homens que fazem sexo com homens, homens e mulheres trabalhadores do sexo, pessoas com outras infecções sexualmente transmissíveis, principalmente HIV, HBV e HCV), foram detectadas altas prevalências, que variaram entre 0,7% e 5,3%.¹⁶ Ainda, neste mesmo Boletim foram apontadas as principais vias de transmissão/aquisição destes vírus no momento atual, quais sejam: vertical (principalmente pelo aleitamento materno), sexual (por meio do sexo sem uso de preservativo), e parenteral (por compartilhamento de seringas e/ou agulhas infectadas, acidentes com material perfurocortante, tatuagens, escarificação, autoflagelação).¹⁶ Há que

se destacar que a transmissão parenteral por sangue e transplante de órgãos e tecidos infectados praticamente não existe, pois a sorologia para HTLV tornou-se obrigatória em bancos de sangue do país em 1993,¹⁷ e em doadores e receptores de órgãos e tecidos em 2009.¹⁸

Estrutura da partícula viral e genoma dos HTLVs

Os HTLVs são partículas esféricas do tipo C, com cerca de 100 nanômetros (nm) de diâmetro. Apresentam uma camada bilipídica externa, com um envelope glicoproteico formado por uma proteína de superfície e uma transmembrana, que recobre outra estrutura interna, denominada de *core*. O *core* contém várias cópias da transcriptase reversa (TR) ligadas a duas moléculas idênticas de fita simples de RNA, que no HTLV-1 possui 9.032 pares de base (pb) e no HTLV-2, 8.952 pb. O material genético viral (RNA) codifica proteínas (p) estruturais e reguladoras da expressão do vírus. O gene *gag* codifica uma proteína interna do *core* que, por ação da protease, produz três novos peptídeos: matriz (MA, p19), capsídeo (CA, p24) e nucleocapsídeo (NC, p15). Essas proteínas são rearranjadas para formar os componentes principais da estrutura do vírus maduro.¹⁹ Durante a maturação, o capsídeo se condensa para formar uma estrutura eletro densa, que é característica dos vírus do tipo C; o gene *env* codifica uma proteína precursora do envelope (ENV), que, por clivagem proteolítica e subsequente glicosilação, produz duas glicoproteínas (gp): uma constitui a membrana externa (gp46), e a outra, a transmembrana viral (gp21) (Figura 1).



Legenda: ENV, envelope viral; TR, transcriptase reversa; MA, matriz; NC, nucleocapsídeo; CA, capsídeo; gp, glicoproteína; p, proteína. Adaptado de <http://himmahlinda.web.unej.ac.id/wp-content/uploads/sites/98/2015/05/hiv.png>

Figura 1. Estrutura básica dos HTLVs

Diversamente de outro retrovírus humano (HIV), os HTLVs apresentam replicação muito lenta e raramente são encontrados livres na circulação e em outros fluidos biológicos, apenas no interior de células mononucleares na forma de provírus (DNA). Portanto, a pesquisa desses vírus é realizada no interior de células infectadas. Sua multiplicação se dá por processo de mitose e sua transmissão pelo contato célula-célula por microtúbulos celulares, sinapse ou formação de biofilme.^{19,20}

O genoma proviral dos HTLVs contém os genes estruturais *gag* e *env*, o gene funcional *pol*, os genes reguladores *tax* e *rex* na região *pX*, e os genes reguladores transcritos no sentido anti sentido que codificam as proteínas HBZ (*HTLV-1 bzip fator*) no HTLV-1, e APH-2 (*antisense protein of HTLV-2*) no HTLV-2, e nas extremidades contém

a região terminal de longa repetição (*long terminal repeat*, LTR 5' e 3'), importante na integração do DNA proviral ao DNA da célula hospedeira e na regulação transcricional do seu genoma.¹⁹ O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral (proteína de superfície - gp46 e proteína transmembrana - gp21), as quais são imunogênicas e, portanto, importantes para a resposta celular e humoral. A região *pX* participa da transcrição viral codificando as proteínas reguladoras Tax, Rex, e as proteínas acessórias p12, p13 e p30 no HTLV-1; e p10, p11 e p28 no HTLV-2. No HTLV-1, essas proteínas são importantes para a infectividade viral, a proliferação e imortalização das células, e ainda, podem influenciar a patogênese.¹⁹⁻²¹

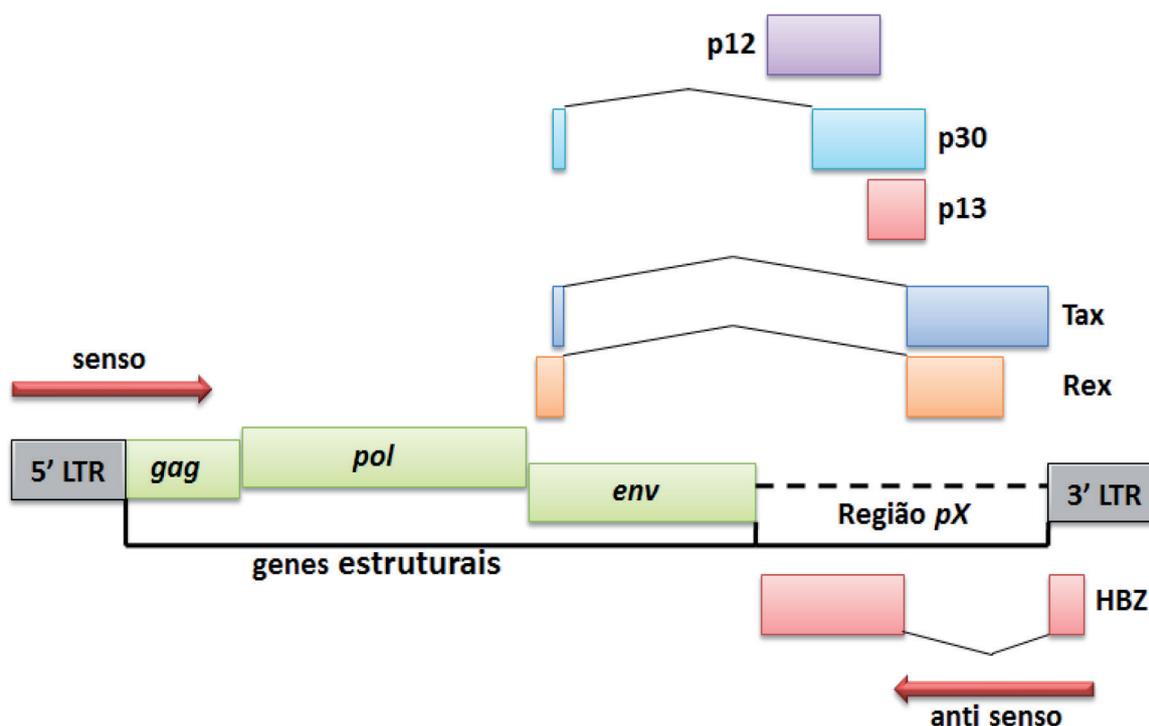


Figura 2. Representação esquemática do genoma proviral de HTLV-1

Histórico do diagnóstico molecular de HTLV

O primeiro trabalho descrevendo a sequência completa de nucleotídeos do HTLV-1 data de 1983.²² Posteriormente, vários

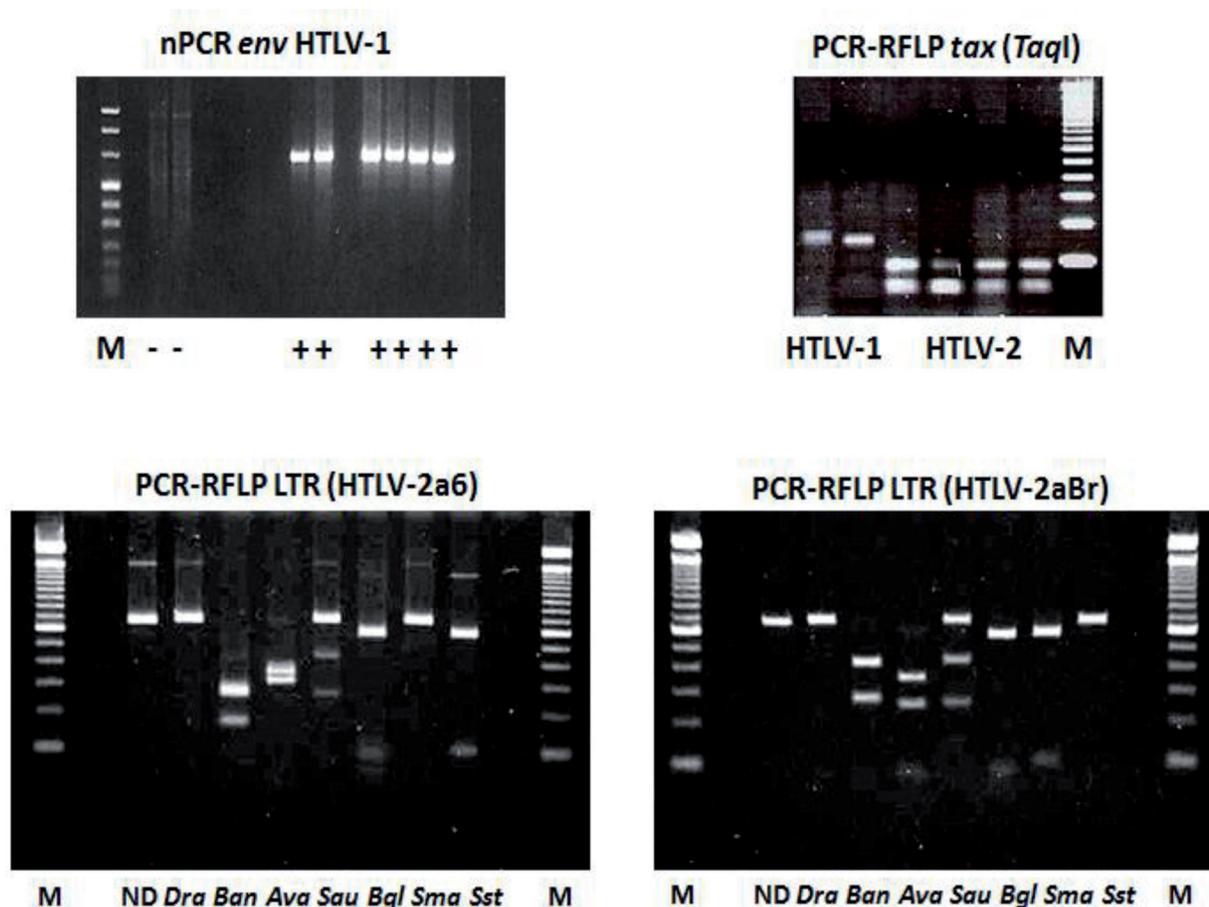
estudos foram realizados e apontaram que os genomas do HTLV-1 e do HTLV-2 eram estáveis. Entre o HTLV-1 e o HTLV-2 havia uma semelhança genômica de aproximadamente 60%, sendo menor para as sequências LTR (30%) e maior dentro dos genes regulatórios *tax/rex* (75% e 80%, respectivamente).²³⁻²⁵ Antes de 1988, as sequências de nucleotídeos de HTLV-1 eram obtidas por clonagem molecular em fagos, seguida de subclonagem em vetor pBR322.^{22,26} A partir daquele ano, com o desenvolvimento e o aprimoramento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), houve um rápido progresso no estudo da epidemiologia molecular, em razão da sua simplicidade, eficiência e rapidez.²⁷ Resumidamente, a PCR amplifica DNA, mesmo presente em pequenas quantidades, utilizando sequências iniciadoras (também conhecidas como *primers*) complementares ao segmento do gene que se pretende amplificar, desoxirribonucleotídeos e DNA-polimerase termorresistente, sendo a mais conhecida, a *Taq* DNA-polimerase. A reação ocorre em termocicladores, onde ciclos repetitivos de reação têm início com a desnaturação da dupla fita de DNA a altas temperaturas (94-98°C), seguida de diminuição de temperatura para pareamento dos *primers* (50-65°C), e aumento de temperatura para a extensão/alongamento da fita de DNA (72 °C, quando usada a *Taq*). Após 30 ciclos de amplificação, cada dupla fita de DNA resulta em aproximadamente um milhão de cópias (2^n onde o n é o número de ciclos, portanto, 2^{30}). Para confirmar que se trata de segmento amplificado do tamanho esperado, o produto é submetido à eletroforese em gel de agarose junto a marcadores de peso molecular (*DNA Ladder*), e visibilizado usando corantes que se intercalam à dupla fita de DNA e emitem fluorescência quando expostos à luz ultravioleta.²⁷

Além de material para o sequenciamento, a PCR seguida da pesquisa de sítios de restrição enzimática possibilitou a subtipagem de HTLVs

pelo polimorfismo no tamanho dos fragmentos (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) obtidos na região LTR do genoma viral, mostrando que havia subtipos virais, geograficamente distintos.²⁸⁻³⁰ Posteriormente, o sequenciamento da região LTR e de outras regiões do genoma proviral dos HTLVs viabilizou a análise filogenética de novos isolados virais, por meio da comparação das sequências com outras já reconhecidas e depositadas no *GenBank* [base de dados de sequências genéticas de domínio público produzido e mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), localizado no *National Institutes of Health* (NIH), USA].

Outra aplicação da PCR referiu-se ao diagnóstico confirmatório de infecção pelos HTLVs. Desde o início da década de 1990 foram utilizadas a PCR e a *nested* PCR (nPCR), visto que, esta última consistiu de uma segunda reação de PCR com o produto amplificado da primeira reação e através do uso de *primers* internos a este segmento. Elas eram visibilizadas com corantes de DNA ou sequências internas ao DNA pesquisado (sondas ou *probes*) marcados com material radioativo ou fluorescente (hibridização), e investigavam diferentes segmentos do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2 (LTR, *pol*, *env* e *tax*).³¹⁻³⁸ No entanto, elas foram utilizadas na ausência de uma padronização em relação aos *primers/probes* e região a ser pesquisada. Ademais, não houve critério único para se considerar uma amostra como sendo positiva, ou seja, alguns estudos consideraram positivas amostras que identificavam apenas um segmento de uma região do genoma proviral, enquanto outros, somente nas ocasiões em que havia positividade para pelo menos dois segmentos de regiões genômicas distintas.^{33,39-43} Porém, foi padronizada uma técnica simples de nPCR, que permitia a amplificação de parte da região *pX* (*tax*) comum aos dois tipos virais, mas que apresentava trocas de nucleotídeos que restringiam os sítios de ação das enzimas *TaqI* e *Sau3* (PCR-RFLP),

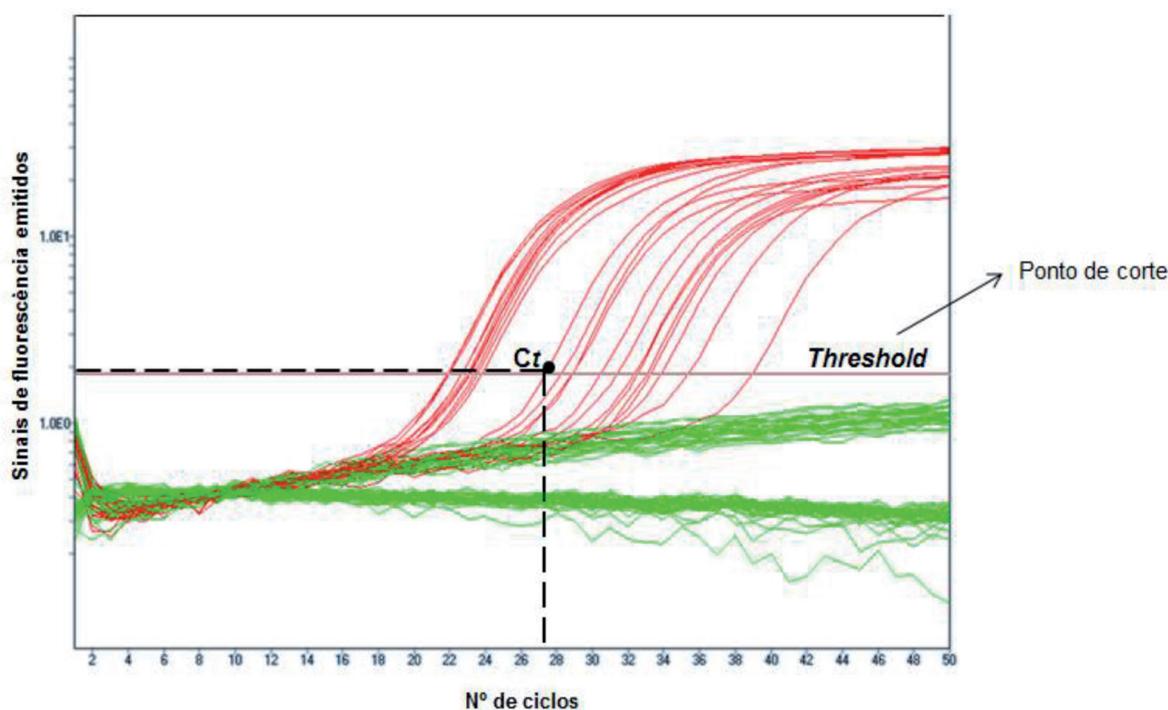
possibilitando discriminar HTLV-1 de HTLV-2.⁴⁴ Apesar de esta técnica ser da década de 1990, é usada ainda hoje rotineiramente no Brasil, para diagnóstico confirmatório e discriminatório de HTLV-1 e HTLV-2 por vários grupos de pesquisa, e também no exterior, com a ressalva de que em alguns laboratórios emprega-se apenas a *TaqI*.^{38,41,44-60} A Figura 3 mostra como são detectados os produtos destas diferentes técnicas de PCR quando submetidos à eletroforese em gel de agarose junto a marcador de peso molecular.



Legenda: M, marcador de peso molecular (DNA Ladder); *TaqI*, enzima de restrição derivada de *Thermus aquaticus* I; *Dra*, enzima derivada de *Deinococcus radiophilus* II; *Ban*, enzima derivada de *Bacillus aneurinolyticus* II; *Ava*, enzima derivada de *Anabaena variabilis* II; *Sau*, enzima derivada de *Staphylococcus aureus* I; *Bgl*, enzima derivada de *Bacillus globigii lacking* I; *Sma*; enzima derivada de *Serratia marcescens* I; *Sst*, enzima derivada de *Streptomyces stanford* II.

Figura 3. Amostras representativas do perfil de bandas de produtos de diferentes tipos de PCR para detecção e caracterização de HTLV-1 e HTLV-2

Também em meados de 1990, foi produzido um *kit* para o diagnóstico molecular confirmatório de infecção por HTLV-1/2 pela empresa ROCHE, o Amplicor HTLV-I/II. Tal teste empregava a técnica de nPCR-*hibridization* com detecção de cor, e pesquisava segmento *pol* de HTLV-1/2.⁶¹ Porém, este *kit* não foi usado como rotina diagnóstica ou pesquisa no Brasil, tampouco ao redor do mundo, havendo poucas publicações disponíveis.^{61,62} Assim, pela escassa procura, sua produção foi descontinuada. Posteriormente, foram desenvolvidas as técnicas de PCR em tempo real ou quantitativa (qPCR), utilizando diferentes protocolos de reação, *primers*, *probes* e sistemas de detecção (*SybrGreen* e sondas de hidrólise), nos formatos *single* e *multiplex*. As qPCR apresentam vantagem em relação às PCR convencionais, pois permitem a amplificação e a detecção simultânea do produto de PCR na fase exponencial da reação, utilizam sistema fechado em todas as etapas da reação e *softwares* para edição e análise dos resultados. Os resultados são expressos em Ct (*cycle threshold*) ou Cq (*Cycle quatification*), que consiste no número do ciclo em que o sinal de fluorescência emitido durante a qPCR atinge um limiar significativo acima da fluorescência de fundo, sendo que a fluorescência aumenta a cada ciclo até atingir o platô (*end-point*). Valores de Cq baixos indicam maiores quantidades de DNA-alvo presente na amostra, pois são necessários menos ciclos de amplificação para atingir o limiar, o que permite mesmo em ensaios qualitativos ponderar sobre flutuações na CPV no seguimento de pacientes (Figura 4).



Legenda: verde, amostras negativas; vermelho, amostras positivas para HTLV

Figura 4. Curvas de amplificação obtidas com a técnica de qPCR

Foram escolhidos para as padronizações de qPCRs para HTLVs a pesquisa dos segmentos *pol* e *tax*, por apresentarem menor variabilidade genética, e utilizados como controle endógeno/gene de referência da reação, segmentos dos genes humanos: albumina, beta-actina, beta-globulina, HLA-DQ, VER-3, RNase P, CD81, GAPDH, e RPP30. Como material de referência foram usadas linhagens infectadas por HTLV-1 ou HTLV-2 (MT2, MT4, TL-Om1, C19) e plasmídeos (Quadro 1).

Muitos laboratórios passaram a empregar as qPCRs com finalidade diagnóstica e também de monitoramento de carga proviral (CPV) nos pacientes.^{54-56,60,63-87} Entretanto, poucos foram os laboratórios que, ao empregá-las, tiveram o cuidado de, além de padronizá-las para as condições do seu laboratório, validá-las.^{78,88-95} Na prática, na maioria das vezes, as técnicas moleculares *in-house* para o diagnóstico de HTLV-1/2 não foram validadas e vêm sendo empregadas como rotina em vários serviços no país. Além disto, elas apresentam formatos

distintos, impossibilitando uma análise comparativa dos resultados obtidos, por diferentes grupos de pesquisadores.

O único estudo multicêntrico de proficiência intra- e inter-laboratorial para determinação de CPV de HTLV-1 disponível na literatura foi realizado no Japão, em 2010.⁹⁴ Os autores demonstraram claramente a necessidade de unificar os protocolos de reação, pois utilizando as mesmas amostras de DNA testadas em diferentes laboratórios e por diferentes analistas, usando a qPCR padronizada em cada um deles, mostraram numa primeira avaliação, o quão variáveis podem ser os resultados obtidos. Numa segunda etapa, uma vez definido o protocolo, e utilizando as mesmas amostras de DNA, plasmídeos contendo a região *pX* como material de referência e controle interno de normatização da reação, os resultados obtidos entre os analistas foram semelhantes.⁹⁴ Houve também por parte dos cientistas japoneses a padronização de um material de referência para ser usado na quantificação de CPV de HTLV-1; linhagem TL-Om1 infectada por HTLV-1 e diluída em células *Jurkat*. Este material foi usado como referência por nove laboratórios do país, com pouca variabilidade nos resultados obtidos.⁹⁵ Atualmente existe um *kit* comercial para pesquisa de HTLV-1/-2 com proposta de comercialização no Brasil pela empresa Medivax. Ele emprega um plasmídeo composto por regiões dos segmentos *pol* do HTLV-1 e HTLV-2 com estimativa de detecção de até duas cópias de HTLV, de acordo com a concentração apresentada pelo plasmídeo. Todavia, não consta seu registro na ANVISA, e ainda necessita ser avaliado com painel de amostras de DNA de pessoas infectadas pelos HTLV-1/2 do Brasil. Ainda, outro ensaio de qPCR de procedência nacional, amplamente divulgado em congressos e na mídia desde o ano de 2010, não logrou ser produzido e comercializado, não havendo, igualmente, seu registro na ANVISA (Rocha Junior, 2014; Patente BR 102014024905-2 A2, depositada em 06/10/2014 e publicada em 12/04/2016).

No que concerne aos ensaios padronizados de qPCR no formato *multiplex*, vários estudos foram realizados,^{64,66,75,78,90} porém, nenhum deles possibilitou sua utilização para pesquisa simultânea de HTLV-1, HTLV-2 e gene de referência, usando diferentes plataformas e reagentes, como ocorreu com um trabalho desenvolvido em 2019 no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.⁹⁶ Por meio dele, foi possível padronizar e validar duas qPCRs para os segmentos *pol* e *tax*, capazes de detectarem HTLV-1, HTLV-2 e gene da albumina humana (*triplex*) em uma única reação, por meio do uso de nove marcas de reagentes (master *mix*) disponíveis no mercado nacional e duas plataformas de PCR em tempo real (ROCHE e ABI). Essas qPCRs *multiplex* empregaram plasmídeos na construção de curvas padrão, e podem ser usadas na determinação de CPV de HTLV-1 e HTLV-2.⁹⁶ O uso de plasmídeos já havia sido descrito anteriormente para a quantificação de CPV de HTLV-1,^{65,89} e foi corroborado em estudo recente desenvolvido por um grupo de pesquisadores de Mato Grosso do Sul, que ressaltaram seu uso e menor custo em relação à compra e manutenção de linhagens celulares para esta finalidade.⁹⁷ Em relação a outros avanços que se referem às NAATs, em 2014 foi padronizada uma qPCR para *tax* de HTLV-1 no formato digital (dqPCR ou *droplet digital*, ddqPCR) e comparada com a qPCR convencional. Ela mostrou ser mais sensível e útil tanto para a detecção quanto para a quantificação de CPV em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano.⁹⁸ A técnica foi empregada também na preparação e titulação de material de referência pelos pesquisadores do Japão.⁹⁵ Resumidamente, a ddqPCR é uma qPCR em que a amostra a ser amplificada é particionada em 20.000 gotas (emulsão água/óleo) juntamente com os reagentes inerentes a uma reação de PCR. Em cada uma destas gotas ocorre uma reação de PCR independente; com isso, são geradas 20.000 replicatas de uma reação. Posteriormente, cada uma destas gotas é analisada por um sistema semelhante a um citômetro de fluxo, no qual se detectam gotas positivas (que

tiveram amplificação da sequência-alvo e emitiram fluorescência) e/ou negativas. É uma técnica que requer reagentes de elevado custo e equipamento sofisticado, e se presta principalmente para pesquisa em material biológico com baixa CPV e de difícil obtenção. Não necessita de curva-padrão para a determinação de CPV.

Em 2018, foi padronizada uma ddqPCR para detecção de segmentos *tax* de HTLV-1 e HTLV-2, demonstrando ótimos resultados para o diagnóstico, bem como, para a determinação de CPV, e no descarte da infecção em amostras com resultado indeterminado à análise pelo WB.⁹⁹ Devido à alta sensibilidade da ddqPCR, a técnica foi utilizada em lavado broncoalveolar de aborígenes australianos que apresentavam bronquiectasia, e foi possível confirmar a presença de HTLV-1c neste material biológico e sua associação com a doença. Foram utilizados como alvos as regiões *tax* e *gag* de HTLV-1.¹⁰⁰ Apesar desses avanços, as técnicas de qPCR em seus vários formatos ainda são técnicas de elevado custo e que necessitam de infraestrutura laboratorial. Uma alternativa interessante de NAAT é a técnica conhecida como LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) ou amplificação isotérmica mediada por alça,¹⁰¹ onde são empregados vários conjuntos de *primers* e uma polimerase com alta atividade de deslocamento de fita, além de uma atividade de replicação. Em síntese, a amplificação de DNA na metodologia de LAMP ocorre a partir de sucessivas etapas de reiniciação da síntese sempre que uma cadeia de fita simples é liberada após deslocamento decorrente da produção de uma nova dupla-fita. Esse fenômeno somente é possível por meio do uso de uma DNA polimerase com atividade de deslocamento (DNA polimerase *Bst*, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus*), em conjunto com dois pares de *primers*, um interno e outro externo. Estes *primers* são especialmente desenhados e reconhecem seis regiões distintas no DNA-alvo, o que confere alto nível de especificidade e reduz o risco de

possíveis ampliações inespecíficas. A técnica é realizada em tubos a uma temperatura constante variando entre 60–65 °C, usando apenas um banho-maria ou bloco aquecedor. A reação pode ser seguida em tempo real com a adição de corantes como SYBR *green* para criar uma mudança de cor visível a olho nu, sem necessidade de aparelho (Figura 5), ou pode ser medida com maior acurácia utilizando equipamento apropriado.¹⁰¹

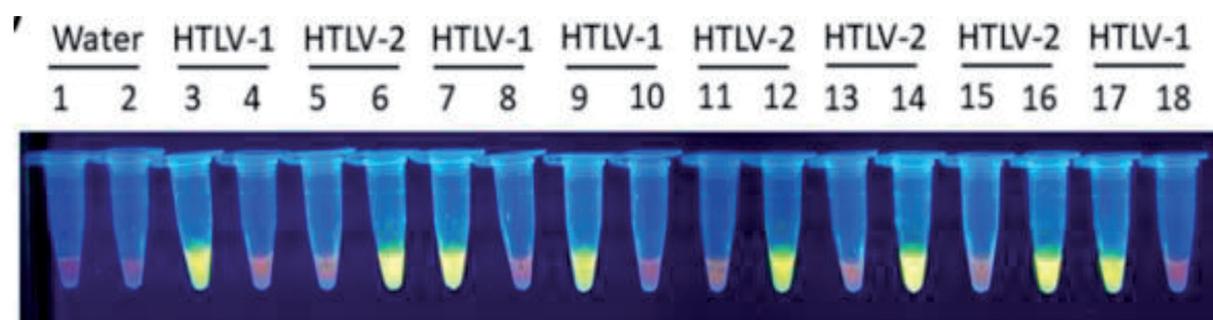


Figura 5. Visualização da técnica de LAMP para HTLV-1 e HTLV-2 com a adição de corante SYBR *green* aos tubos de reação. Fonte: Gomes et al., 2020¹⁰²

Recentemente, no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ-RJ, foi padronizada e validada a estratégia LAMP para o diagnóstico de HTLV-1 (*tax*) e HTLV-2 (*tax*) usando amostras de pacientes com HAM/TSP e de indivíduos infectados por HTLV-1 e HTLV-2 do Rio de Janeiro e de São Paulo, exibindo resultados de sensibilidade e especificidade semelhantes aos obtidos com as técnicas de qPCR (*tax*) e PCR-RFLP (*tax*)^{101,102}. Demonstra ser uma técnica promissora para laboratórios que não dispõem de infraestrutura e equipamentos de PCR e qPCR. Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas sofisticadas que detectam segmentos de DNA, como: *microarrays* (microarranjos de DNA) para triagem em bancos de sangue, sendo que uma delas incluiu a pesquisa de HTLV-1 e HTLV-2;¹⁰³ biossensores eletroquímicos para detectar fragmentos de DNA de HTLV-1;^{104,105} e um sistema universal do tipo *point-of-care* totalmente automatizado

para quantificação de CPV de HTLV-1.¹⁰⁶ Este último sistema foi idealizado por pesquisadores da Alemanha como uma plataforma de trabalho que se assemelha a uma centrífuga; nele é feita a extração de RNA genômico, transcrição para c-DNA, amplificação e detecção do material amplificado usando a técnica LAMP, com finalização em 2h e 10min¹⁰⁶. Apesar dessas inovações tecnológicas, elas ainda não se aplicam à realidade brasileira. Ademais, essas técnicas não foram validadas para uso com amostras clínicas de pacientes de diferentes regiões geográficas, tampouco se encontram disponíveis no comércio.

Enfim, devido à alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, diferentes ensaios moleculares voltados ao HTLV foram publicados ao redor do mundo e estão compilados ao final deste texto, no Quadro 1, que reúne informações sobre a autoria, técnica empregada, genes alvo e objetivo do estudo, entre outros.^{4,31-102,118-127}

Limitações das técnicas moleculares de diagnóstico

As NAATs podem sofrer interferência e acarretar em erros ou dificuldades no diagnóstico de HTLVs devido a vários motivos, os quais incluem: transporte e armazenamento incorreto da amostra biológica (degradação do material genético); má qualidade do material a ser amplificado (sujidades presentes nas amostras); escolha inadequada de *primers/probes*; baixa CPV, principalmente de HTLV-2 (abaixo do limite de detecção da técnica utilizada); tratamento com antirretrovirais (flutuações de CPV); mutações pontuais em regiões promotoras do LTR viral e em regiões que codificam proteínas estruturais e reguladoras, principalmente de envelope viral (dificulta ou impede pareamento de *primers/probes*); presença de partículas virais defectivas (principalmente de LTR 5', mas também de outros segmentos do genoma viral); entre outras.^{4,32,42,54,56,77,79,86,96,102,107-117}

No entanto, apesar dessas limitações, poucos são os casos de

resultados falso-negativos nos testes moleculares usados atualmente para o diagnóstico de HTLVs que pesquisam as regiões *pol* ou *tax*. Em casos nos quais o teste molecular resulte negativo, mas na triagem sorológica sejam detectados altos títulos de anticorpos e/ou em pacientes com sintomas compatíveis com doenças relacionadas ao HTLV-1, sugere-se recorrer ao teste confirmatório sorológico LIA, ou realizar um novo teste molecular para pesquisa de outra região do genoma proviral¹. Recentemente, foi descrito em um paciente da Argentina, presença de partícula defectiva em *tax* e sugerido padronização de ensaios *multiplex* utilizando combinação de mais de um alvo para o diagnóstico.¹¹⁶ Essa sugestão é corroborada pelos trabalhos desenvolvidos no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, que revelam falhas no diagnóstico molecular quando se emprega apenas um teste molecular e existe a presença de partícula proviral defectiva.^{96,115,117}

Considerações finais

Em março de 2018 foi redigida uma carta aberta à Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*, WHO) pelos pesquisadores Fabiola Martin, Yutaka Tagaya e Robert Gallo, publicada na revista *The Lancet*, solicitando ao Dr. Tedros Adhanom (Diretor-Geral) maior atenção ao HTLV-1 e sua erradicação, devido a: gravidade das doenças a ele relacionadas, alta prevalência mundial, desprover de cura, e apresentar a possibilidade de ser controlado adotando-se medidas de prevenção da transmissão que incluem: maior conhecimento e divulgação do que é o HTLV-1, diagnóstico correto, sorologia no pré-natal, entre outros.¹²⁸ Para uma maior compreensão do problema exposto, é válido ressaltar que, o HTLV-1 sequer consta da lista de infecções/doenças negligenciadas da WHO e do Ministério da Saúde do Brasil, e não é de notificação compulsória.

Não obstante, existem grupos de pesquisadores espalhados em todo o mundo que se dedicam ao estudo e à divulgação dos HTLVs; é o caso da Associação Internacional de Retrovirologia (*International Retrovirology Association*, IRVA) que tem publicado protocolos clínicos para manejo da ATL e HAM/TSP (*guidelines*), notícias de eventos importantes sobre HTLV, e pesquisas recentes (publicações) de todas as partes do mundo.¹²⁹ Em 2018, a IRVA instituiu o Dia Mundial do HTLV - 10 de Novembro,¹³⁰ e desde então, várias atividades vêm sendo desenvolvidas nesta data, na intenção de promover maior visibilidade ao HTLV.

Outra iniciativa bem-sucedida foi a criação, em 2020, do HTLV *Channel* no site de compartilhamento de vídeos YouTube.¹³¹ Este canal foi idealizado por duas pesquisadoras brasileiras, Tatiane Assone e Carolina Rosadas, com o objetivo de divulgar e discutir questões relacionadas a vários aspectos da infecção por HTLV, incluindo pesquisa básica e aplicada, diagnóstico, comorbidades, tratamento, prevenção, e direitos humanos. Em linguagem simples, as *lives* são direcionadas ao público em geral, portadores, pacientes e familiares de pessoas infectadas por HTLV, além de pesquisadores, médicos e outros profissionais da área da saúde.¹³¹

Todavia, sem dúvida alguma, um grande impulso ao HTLV-1 vem sendo dado nos últimos anos pela Coordenação-Geral de Vigilância das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (CGIST/DCCI/SVS/MS), na pessoa da Dra. Angélica Espinosa Barbosa Miranda e apoiado pelo Diretor-Geral do DCCI, Dr. Gerson Fernando Mendes Pereira, que abraçaram a causa, e decidiram elaborar com o auxílio de grupo técnico de especialistas em HTLV, o documento intitulado Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para HTLV (PCDT-HTLV),

e incluir o HTLV em outro Protocolo de Infecções Sexualmente Transmissíveis.^{132,133} No PCDT-HTLV, o Instituto Adolfo Lutz, na pessoa da pesquisadora Adele Caterino de Araujo, foi convidado a participar e coordenar o capítulo de Diagnóstico Laboratorial. Uma prévia do PCDT-HTLV foi apresentada durante um Webinar comemorativo ao Dia Mundial do HTLV em 10 de novembro de 2020, cuja íntegra se encontra disponível no HTLV *Channel*.¹³⁴ Outra *live* sobre diagnóstico também se encontra no mesmo canal e destaca a atuação do Instituto Adolfo Lutz em 30 anos de pesquisa em HTLVs.¹³⁵ Concluindo, com a notoriedade que o HTLV-1 vem ganhando junto à WHO que recentemente elaborou um relatório técnico sobre HTLV-1 e incluiu o teste molecular no diagnóstico confirmatório,¹³⁶ e com a conclusão do PCDT-HTLV e envio a CONITEC para sua implementação dentro do âmbito do SUS, as técnicas moleculares farão parte do algoritmo de testes laboratoriais para HTLV de maneira universal no Brasil. Portanto, essa revisão narrativa auxiliará na implantação desta política pública de enfrentamento ao HTLV, fornecendo subsídios para a escolha dos testes que mais se adequam à realidade brasileira.

Quadro 1. Técnicas moleculares usadas no diagnóstico confirmatório e discriminatório, caracterização molecular e determinação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2.

Autor(es) e Ano	Local	Técnica(s)	Gene(s) alvo	Critério/sensibilidade	Aplicação
Matsumoto et al, 1990 ³⁹	Tokio, Japão	nPCR	<i>pX (tax)</i>		Diagnóstico de HTLV-1 e comparação com IF
Heneine et al, 1992 ³¹	Atlanta, EUA	nPCR-hibridização líquida	<i>tax</i> HTLV-1 <i>pol</i> HTLV-2		Padronização diagnóstico confirmatório/discriminatório
Tuke et al., 1991 ⁴⁴	Londres, Reino Unido	nPCR-RFLP	<i>tax</i> HTLV-1 e -2 TaqI e Sau3A		Diagnóstico diferencial de HTLV-1 e HTLV-2
De-Araujo et al, 1994 ³²	São Paulo (casos) Itália (teste)	nPCR-hibridização líquida	<i>tax/rex</i> HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório.
Garin et al, 1994 ³³	Zaire, África	nPCR-hibridização líquida, para HTLV-1 e HTLV-2	LTR, <i>pol</i> e <i>tax</i>	2 PCR+	Diagnóstico confirmatório e discriminatório. Uso em WB-Indeterminado
Vallejo e García-Sáiz, 1995 ³⁴	Madri, Espanha	nPCR-hibridização líquida, para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pol</i> <i>env</i>	1,5 pg MT2 e 5 pg Mo 1,5 pg MT2 e Mo	Padronização diagnóstico confirmatório/discriminatório
Vrielink et al, 1997 ⁶¹	Nova Jersey, EUA	nPCR-hibridização e detecção por cor	<i>pol</i> HTLV-1/-2	Uso de painel para cálculo sensibilidade e especificidade	Padronização <i>kit</i> comercial para detectar HTLV-1/2 (Amplicor HTLV-I/II Roche)
Caterino-de-Araujo et al, 1998 ⁴⁰	São Paulo (casos) Itália (teste)	nPCR para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> <i>env</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório.
Liu et al, 1999 ⁶²	São Francisco, EUA	nPCR-hibridização e detecção por cor (<i>kit</i> Roche)	<i>pol</i> HTLV-1/-2		Em população de risco como teste de triagem e confirmatório
Soldan et al, 1999 ³⁵	Washington, EUA	nPCR-hibridização líquida p/ HTLV-1 e -2 RT-PCR	LTR, <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>tax</i> , <i>env</i> <i>tax</i>		Para detectar HTLV-1/-e em amostras de sangue com WB-Indeterminado
Vet et al, 1999 ⁸⁸	Nova York, EUA	RT-PCR multiplex Beacon	<i>gag</i> HIV-1 <i>env</i> HIV-2 <i>tax</i> HTLV-1 <i>pol</i> HTLV-2 Plasmídeo (MR)	10 cópias de cada gene	Padronização diagnóstico confirmatório/discriminatório
Poiesz et al, 2000 ³⁶	EUA, Paraguai, Argentina, Venezuela (casos) EUA (teste)	nPCR-hibridização para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pol</i> HTLV-1 e HTLV-2	Melhor para HTLV-2	Diagnóstico confirmatório e para comparação com WB em população de UDI e indígenas
Castro-Costa et al, 2001 ¹¹⁸	Ceará, Brasil	PCR nPCR	LTR, <i>tax</i> , <i>gag</i> <i>pol</i> , <i>env</i>		Diagnóstico confirmatório em casos de TSP HTLV-soronegativos
Césaire et al, 2001 ⁶³	Martinica (casos) França (teste)	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1, albumina hu (CI)		Diagnóstico na coinfeção HIV/HTLV-1

Deheé et al, 2002 ⁸⁹	Martinica (casos) França (teste)	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1, albumina hu (CI) MT2 (MR)	10 cópias	Determinação de CPV de HTLV-1 em TSP/HAM e portador assintomático
Segurado et al, 2002 ¹¹⁹	São Paulo, Brasil	nPCR-RFLP HTLV-1 e HTLV-2	<i>Tax</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Colin et al, 2003 ¹²⁰	Acre, Brasil	nPCR HTLV-1 e -2	<i>pol</i> HTLV-1 e -2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em doadores de sangue com WB-Indeterminado
Estes e Sevall, 2003 ⁶⁴	EUA	qPCR <i>multiplex</i> HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> HTLV-1 LTR HTLV-2, beta-globina hu (CI) MT2 e Mo (MR)	48 cópias	Diagnóstico confirmatório e CPV em pacientes de ambulatório de HTLV
Kamihira et al., 2003 ⁶⁵	Nagasaki, Japão	qPCR HTLV-1	<i>tax</i> HTLV-1 beta-globina hu (CI) plasmídeo (MR)	301 cópias/10 ⁴ PBMC	Determinação de CPV de HTLV-1 em ATLL e portador assintomático
Santos et al, 2003 ¹²¹	Ceará (casos) Bélgica (testes)	nPCR	<i>tax</i> HTLV-1 e -2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos WB-Indeterminados
Gallego et al., 2004 ⁴⁵	Córdoba, Argentina	nPCR-RFLP	<i>tax</i> HTLV-1 e -2 <i>TaqI</i> e <i>Sau3A</i>	Mais sensível que a PCR-hibridização <i>pol</i> para HTLV-2	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e comparação com PCR-hibridização <i>pol</i>
Lee et al, 2004 ⁶⁶	São Francisco, EUA	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> MT2 <i>tax</i> Mo HLA-DQ (CI)	1.6 cópias/10 ⁴ HTLV-1 2.8 cópias/10 ⁴ HTLV-2	Para determinar CPV e relacionar com patogênese
Mangano et al, 2004 ⁴¹	Buenos Aires, Argentina	nPCR nPCR-RFLP	<i>pol</i> e <i>env</i> <i>tax</i> beta-actina hu (CI)	2 PCR+	Diagnóstico confirmatório e discriminatório em doadores de sangue com WB-Indeterminado
Murphy et al, 2004 ⁶⁷	São Francisco, EUA	qPCR SybrGreen	<i>tax</i>		Para comparar CPV de HTLV-1 e HTLV-2, e de HTLV-2a e HTLV-2b
Vallinoto et al, 2004 ⁴⁶	Pará, Brasil	nPCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pX</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e para caracterização molecular
Laurentino et al, 2005 ⁴⁷	Pará, Brasil	nPCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório

Montanheiro et al, 2005 ⁶⁸	São Paulo, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 albumina hu (CI) MT-2 (MR)	10 cópias/10 ⁴ PBMC	Determinação de CPV de HTLV-1 em TSP/HAM e portador assintomático
Olindo et al, 2005 ⁶⁹	Martinica	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1		Determinação de CPV de HTLV-1 e progressão para doença
Yakova et al, 2005 ⁷⁰	Martinica (casos) França (teste)	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 albumina hu (CI) plasmídeo e MT-2 (MR)		Determinação de CPV em doenças do tecido conectivo e casos de artrite reumatóide
Best et al., 2006 ⁷¹	Lima, Peru	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> HTLV-1 VER-3 (CI) Plasmídeo (MR)		Determinação de CPV de HTLV-1 em TSP/HAM e portador assintomático
Costa et al, 2006 ³⁷	São Paulo, Brasil	nPCR-hibridização líquida com ³² P e fosfatase alcalina	<i>pol</i>	120 pg DNA	Padronização de técnica enzimática e comparação com marcação radioativa
Kashima et al, 2006 ¹²²	São Paulo e Rio de Janeiro, Brasil	PCR	<i>tax</i> e LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Souza et al, 2006 ⁴⁹	Pará, Brasil	nPCR-RFLP nPCR	<i>pX</i> LTR HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Tamegão-Lopes et al, 2006 ⁷²	Pará, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 e HTLV-2 Albumina hu (CI)	226 cópias/mm ³ de sangue	Determinação de CPV de HTLV-1
Vallinoto et al, 2006 ⁴⁸	Marajó, Brasil	nPCR-RFLP nPCR	<i>pX</i> LTR HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Vitone et al, 2006 ⁷³	Bolonha, Itália	qPCR SybrGreen	<i>pol</i> HTLV-1 beta-globina hu (CI) MT-2 (MR)	10 cópias	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e uso em WB-indeterminados
Berini et al, 2007 ⁵⁰	Buenos Aires, Argentina	nPCR PCR-RFLP	<i>pol</i> HTLV-1 e -2 <i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos WB-indeterminados
Casseb et al, 2007 ⁵¹	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP	<i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório
Ishak et al, 2007 ⁵²	Pará, Brasil	PCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>px</i> e <i>env</i> <i>TaqI</i>		Diagnóstico em população indígena soronegativa na triagem e HTLV-2 positiva

Morimoto et al, 2007 ⁴²	Paraná, Brasil	nPCR para HTLV-1 e HTLV-2	LTR, <i>env</i> , <i>tax</i>	2 PCR+	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e uso em WB-indeterminados
Pimenta et al, 2007 ¹²³	Paraíba, Brasil	nPCR	LTR, <i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório em lactantes
Zehender et al, 2007 ⁵³	Lima, Peru	nPCR-RFLP nPCR	<i>tax</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e caracterização molecular
Arruda et al, 2008 ⁷⁴	Pernambuco, Brasil	qPCR SybrGreen	<i>pol</i> HTLV-1 <i>env/tax</i> HTLV-2 albumina hu (CI)	Sensibilidade qualitativa 87.9% e para CPV 100%	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e determinação de CPV de HTLV-1 e HTLV-2
Dal Fabro et al, 2008 ¹²⁴	Mato Grosso do Sul, Brasil	PCR-RFLP	<i>tax</i> <i>HinfI</i> (HTLV-1) <i>AvaI</i> (HTLV-2)		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos com WB-indeterminado em gestantes
Montanheiro et al, 2008 ⁵⁴	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP e qPCR TaqMann para HTLV-1 e HTLV-2	<i>tax</i> <i>pol</i>	10 cópias/10 ⁴ PBMC	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e CPV de casos de HTLV-2
Besson e Kazanji, 2009 ⁷⁵	Gabão (casos) França (teste)	qPCR <i>multiplex</i> Beacons	<i>tax</i> HTLV-1, -2, -3 <i>tax</i> STLV-1 e 3 MT4, C19, HTLV-3 (MR) albumina hu (CI)	1 a 10 cópias em pelo menos 100 células	Diagnóstico confirmatório e discriminatório e CPV em países onde circulam estes vírus
Costa e Segurado, 2009 ³⁸	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP nPCR-hibridização c/ fosfatase alcalina	<i>tax</i> <i>pol</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos de WB-indeterminado
Moens et al., 2009 ⁹⁰	Peru, França, Bélgica	qPCR <i>triplex</i> Sybr Green	<i>tax</i> (HTLV-1, -2 e STLV-3) beta-globina hu (CI)		Padronização e validação de qPCR triplex para retrovírus e qPCR single para beta-globina
Nascimento et al, 2009 ¹²⁵	Goiás, Mato Grosso do Sul, Brasil	nPCR	<i>tax</i> e LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em quilombolas
Primo et al, 2009 ⁷⁶	Bahia, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1		Determinação de CPV em TSP/HAM e dermatites
Andrade et al., 2010 ⁹¹	Minas Gerais, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 e -2 MT2 e plasma (MR) Albumina hu (CI)	Sensibilidade 99,4% e 98,5% em relação ao WB	Diagnóstico confirmatório e discriminatório

Kamihira et al, 2010 ⁹⁴	Tokio, Japão	qPCR TaqMan	tax HTLV-1 RNase P, beta-globina, beta-actina, CD81 hu (CI) Linhagens e plasmídeo (MR)	Melhores resultados com plasmídeo como MR, mas necessita de CI	Ensaio de proficiência intra- e inter-laboratorial
Martins et al, 2010 ¹²⁶	Minas Gerais, Brasil	nPCR	env HTLV-1		Determinação de infecção durante soroconversão de longo tempo e diagnóstico confirmatório em casos WB-indeterminado
Olah et al, 2010 ⁵⁵	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP qPCR TaqMan para HTLV-1 e HTLV-2	tax (<i>TaqI</i> e <i>Sau3A</i>) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2)		Diagnóstico confirmatório de HTLV-2 em casos de WB-Indeterminado e CPV de HTLV-2
Costa et al, 2011 ⁵⁶	São Paulo, Brasil	PCR-RFLP nPCR qPCR TaqMan para HTLV-1 e -2	tax (<i>TaqI</i>) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2) albumina hu (CI)	Sensibilidade PCR 77,4% e qPCR 79,25%	Diagnóstico confirmatório e discriminatório
Neto et al, 2011 ⁷⁷	São Paulo, Brasil	qPCR SybrGreen	tax (HTLV-1)		Determinação de CPV de HTLV-1 e associação com mutação em TRE na LTR
Waters et al., 2011 ⁷⁸	Rio de Janeiro, Brasil Irlanda	qPCR <i>multiplex</i>	<i>pol</i> (HTLV-1), tax (HTLV-2) e Albumina hu (CI) plasmídeo, MT2 e CEM (MR)	1-10 cópias	Padronização e determinação de CPV e diagnóstico confirmatório em casos WB-indeterminados
Zanjani et al, 2011 ⁴³	Mashhad, Irã	PCR	<i>gag</i> , tax (HTLV-1) <i>pol</i> (HTLV)	2 PCR+ associado com maior DO no EIA e perfil <i>rgp46-l</i> , <i>GD21</i> , <i>gp21</i>	Diagnóstico confirmatório em casos WB-indeterminado
Berini et al, 2012 ⁵⁸	Buenos Aires, Argentina	nPCR PCR-RFLP	<i>pol</i> tax		Diagnóstico confirmatório e discriminatório em casos de WB-indeterminado
Cabral et al, 2012 ⁷⁹	São Paulo, Brasil	qPCR TaqMan nPCR	<i>pol</i> HTLV-1 tax (HTLV-1)		Determinação de CPV de HTLV-1 em PBMC e RNA viral em plasma
Olavarria et al, 2012 ⁸⁰	Bahia, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i> HTLV-1 Albumina hu (CI)		Determinação de CPV de HTLV-1 na TSP/HAM e portador assintomático, estabilidade de CPV com o tempo
Furtado et al, 2012 ⁹²	Minas Gerais, Brasil	qPCR SybrGreen	<i>pol</i> (HTLV-1) Albumina hu (CI) MT2 (MR)	<i>Cutoff</i> para TSP/HAM 114 cópias/10 ⁴ PBMC, sensibilidade 78,2%	Determinação de CPV de HTLV-1 e curva ROC para risco de TSP/HAM

De Oliveira et al, 2012 ⁵⁷	Piauí (casos) Pará (teste)	nPCR-RFLP nPCR	<i>pX</i> LTR		Diagnóstico confirmatório e discriminatório de HTLV-1 e HTLV-2 e caracterização molecular
Ribeiro et al, 2012 ⁸¹	Minas Gerais, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol-alb</i> (HTLV-1) <i>pol</i> (HTLV-2)		Confirmação transmissão vertical de HTLV
Souza et al, 2012 ⁸²	Maranhão, Brasil	qPCR TaqMan	<i>pol</i>		Determinação de prevalência em gestantes
Costa et al, 2013 ⁵⁹	Pará, Brasil	PCR-RFLP	<i>tax</i>		Diagnóstico confirmatório e discriminatório de HTLV-1 e HTLV-2
Castro et al, 2013 ⁸³	Córdoba, Argentina	qPCR SybrGreen	<i>tax</i> (HTLV-1) albumina hu (CI) MT2 (MR)	3 cópias	Diagnóstico confirmatório e monitoramento de CPV de HTLV-1
Rosadas et al, 2013 ⁹³	Rio de Janeiro, Brasil	qPCR TaqMan	<i>Tax</i> (HTLV-1) beta-actina hu (CI)	1 cópia	Validação de qPCR HTLV-1
Abad-Fernández et al, 2014 ⁸⁴	Madri, Espanha	qPCR TaqMan	<i>Tax</i> (HTLV-2) GAPDH (CI) Plasmídeo (MR)	50 cópias/10 ⁶ PBMC	Determinar efeito de raltegravir na infecção por HTLV-2
Galetto et al, 2014 ¹²⁷	Rio Grande do Sul, Brasil	PCR-RFLP para HTLV-1 e HTLV-2	<i>pol</i>		Determinar prevalência de coinfeção HIV/HTLV
Ishihara et al, 2014 ⁸⁵	Nagasaki, Japão	qPCR e nq-PCR	<i>pX</i> (HTLV-1) beta-globina hu(CI)		Teste confirmatório para HTLV-1 pós triagem pelo CLIA
Cánepa et al, 2015 ⁸⁶	Argentina	nPCR qPCR SybrGreen	<i>pol, tax, LTR</i> (HTLV-1) <i>pol</i> (HTLV-1) albumina hu (CI)		Teste confirmatório em casos de WB-indeterminado e CPV baixa. Pesquisa de mutações pontuais em <i>tax</i> e LTR e caracterização filogenética.
Nasir et al, 2015 ⁸⁷	Nigéria, África	qPCR	<i>tax</i> HTLV-1		Diagnóstico confirmatório e CPV de HTLV-1
Campos et al., 2017 ⁴	São Paulo, Brasil	nPCR-RFLP qPCR TaqMan	<i>tax</i> (HTLV-1 e -2) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2) albumina hu (CI)		Diagnóstico confirmatório em casos de coinfeção HIV/HTLV
Paiva et al, 2017 ⁶⁰	São Paulo, Brasil	nPCR-RFLP qPCR TaqMan	<i>tax</i> <i>pol</i> (HTLV-1 e -2)		Diagnóstico confirmatório e discriminatório e CPV de casais discordantes
Gonçalves, 2019 ⁹⁶	São Paulo e Recife (casos), São Paulo, Brasil (testes)	qPCR <i>multiplex</i> TaqMan	<i>pol</i> (HTLV-1,-2,CI) <i>tax</i> (HTLV-1,-2,CI) Albumina Hu (CI) Plasmídeos (MR)	2 cópias para HTLV-1 19 cópias HTLV-2 3 cópias para HTLV-1 31 cópias HTLV-2	Padronização, validação e diagnóstico confirmatório em ensaio <i>triplex</i> com 9 marcas de reagentes e 2 plataformas de PCR (Roche e ABI)

Bandeira et al., 2020 ⁹⁷	Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro (Brasil)	qPCR TaqMan	<i>tax</i> (HTLV-1) Beta actina hu (CI) Plasmídio (<i>px</i>) e TARL-2 (MR)		Padronização e validação do uso de plasmídeos para construção de curva padrão para HTLV-1
Kuramitsu et al., 2018 ⁹⁵	Japão	dqPCR	<i>pX</i> (HTLV-1) RNaseP TL-Om1 cells (MR)	2,71 cópias/100cel	Diagnóstico e monitoramento de CPV
Brunetto et al., 2014 ⁹⁸	Washington, EUA	ddqPCR	<i>tax</i> HTLV-1 RPP30 (CI)		Quantificação de CPV de HTLV-1 em casos de HAM/TSP
Hedberg et al., 2018 ⁹⁹	Suécia e Reino Unido	ddqPCR	<i>tax</i> HTLV-1 e HTLV-2		Diagnóstico confirmatório, determinação de CPV, descarte de infecção em casos WB indeterminados
Yurick et al., 2019 ¹⁰⁰	Austrália	ddqPCR	<i>gag e tax</i> (HTLV-1) RPP30 (CI)		Diagnóstico de bronquiectasia associada ao HTLV-1c usando PCRduplex
Gomes et al., 2020 ^{101,102}	Rio de Janeiro, Brasil (testes) Rio de Janeiro e São Paulo (casos)	LAMP, PCR-RFLP qPCR,	<i>tax</i> (HTLV-1 e -2) <i>pol e tax</i> (HTLV-1 e -2)	Sensibilidade semelhante a qPCR e PCR-RFLP	Padronização e validação da técnica LAMP-HTLV para diagnóstico
Campos et al. 2020 ¹¹⁵	São Paulo, Brasil	nPCR PCR-RFLP qPCR	LTR, <i>env, tax</i> (HTLV-1 e -2) <i>tax</i> (HTLV-1 e -2) <i>pol</i> (HTLV-1 e -2)		Pesquisa de partículas defectivas e negatividade nos ensaios moleculares de diagnóstico
Blanco et al., 2021 ¹¹⁶	Córdoba, Argentina	qPCR nPCR	<i>pol</i> (HTLV-1 e -2) <i>env, LTR</i> (HTLV-1 e -2)		Apresentação de caso de HTLV-1 com presença de partícula defectiva em <i>tax</i>

Legenda: PCR, reação em cadeia da polimerase; nPCR, PCR nested ou aninhada; PCR-RFLP, PCR seguida de pesquisa de tamanho de fragmentos de restrição enzimática; qPCR, PCR em tempo real ou quantitativa; dqPCR, PCR quantitativa digital; ddqPCR, PCR quantitativa digital em gotas; CI, controle interno de reação; MR, material de referência; CPV, carga proviral; WB, Western blotting; TSP, paraparesia espática tropical; HAM, mielopatia associada ao HTLV-1; MT-2, linhagem celular infectada por HTLV-1; Mo, linhagem celular infectada por HTLV-2

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Caterino-de-Araujo A, Barbosa-Stancioli EF, Alonso Neto JB, Aragón MG, Galvão-Castro B, Ishak R, et al. Laboratory diagnosis of HTLV in Brazil: assays, flowcharts, challenges and perspectives. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021; 54:e0175-2021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0175-2021>
2. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns for HTLV-I/II and its temporal trend in high-risk populations attended at Public Health Units of São Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2008;42(2):149-55, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.01.017>
3. Caterino-de-Araujo A, Campos KR, Petrucci TVB, da Silva RX, Lemos MF, Moreira RC. Surveillance of human retroviruses in blood samples from patients with hepatitis B and C in São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53:e20190378. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0378-2019>
4. Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Caterino-de-Araujo A. Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting HTLV-1 and HTLV-2 in patients infected with HIV-1. *Brazilian J Infect Dis.* 2017;21(3):297-305. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.02.005>
5. Campos KR, Santos FLN, Brito VS, Gonçalves NLS, Araujo THA, Galvão-Castro B, et al. Line immunoassay for confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections in inconclusive Western blot serum samples from Brazil. *J Clin Microbiol.* 2020;58(1):e01384-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-19>
6. Okuma K, Kuramitsu M, Niwa T, Taniguchi T, Masaki Y, Ueda G, et al. Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for

- performance evaluation of diagnostic assays in Japan. *Retrovirology*. 2020;17(1):26. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00534-0>
7. ICTV, Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV) Taxonomy - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Acessado em 30 de maio de 2020. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.
 8. 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 USA*. 1980;77(12):7415-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415>
 9. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982;218:571-3. doi: 10.1126/science.6981847.
 10. Bangham CR, Cook LB, Melamed A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin Cancer Biol*. 2014;26:89-98. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.003>
 11. Melamed A, Witkover AD, Laydon DJ, Brown R, Ladell K, Miners K, et al. Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog*. 2014;10(3):e1004006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004006>
 12. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388. doi:10.3389/fmicb.2012.00388.
 13. Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell Lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3): 265-74. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0232-2013>
 14. 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. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-30>

15. 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 USA*. 2005, 102(22):7994-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501734102>
16. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Prevalência da infecção por HTLV-1/2 no Brasil. *Boletim Epidemiológico*. Volume 51 | Nº 48 | Nov. 2020. p.25-33. ISSN: 2358-9450
17. Ministério da Saúde (MS). Portaria 1.376, de novembro de 1993. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 de dezembro de 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências].
18. Ministério da Saúde (MS). Portaria 2.600, de 21 de outubro de 2009. *Diário Oficial da União*, Brasília. [Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes].
19. Proietti AB de FC. HTLV Cadernos Hemominas, Vol. 16. Minas Gerais: Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 2015. Disponível em: <http://www.hemominas.mg.gov.br/publicacoes>
20. Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human retrovirus: from transmission to therapeutic treatment. *Viruses* 2018;10(1):1. doi:10.3390/v10010001.
21. Mesnard J-M, Barbeau B, Césaire R, Péloponèse J-M. Roles of HTLV-1 basic zip factor (HBZ) in viral chronicity and leukemic transformation. Potential new therapeutic approaches to prevent and treat HTLV-1-related diseases. *Viruses* 2015;7:6490–505. doi:10.3390/v7122952
22. Seiki M, hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:3618-22. doi: 10.1073/pnas.80.12.3618

23. Shimotohno K, Wachsman W, Takahashi Y, Golde DW, Miwa M, Sugimura T, et al. Nucleotide sequence of the 3' region of an infectious human T-cell leukemia virus type II genome. *Proc Natl Acad Sc. USA.* 1984;81:6657-61, 1984. <https://www.pnas.org/content/pnas/81/21/6657.full.pdf>
24. Haseltine WA, Sodroski J, Patarca R, Briggs D, Perkins D, Wong-Staal F. Structure of 3' terminal region of type II human T lymphotropic virus: evidence for new coding region. *Science* 1984;225:419-21, 1984. doi: 10.1126/science.6330894
25. Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen ISY, et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82: 3101-5. <https://www.pnas.org/content/pnas/82/10/3101.full.pdf>
26. Malik KT, Even J, Karpas A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T-cell leukemia virus/human T-cell leukemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of the ATLV/HTLV-I subgroup. *J Gen Virol.* 1988;69:1695-710. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1695>
27. Erlich HA. Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol.* 1989;9: 437-47. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00918012>
28. Komurian-Pradel F, Pelloquin F, Sonoda S, Osame M, de Thé G. Geographical subtypes demonstrated by RFLP following PCR in the LTR region of HTLV-I. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8(4):429-34. <https://doi.org/10.1089/aid.1992.8.429>
29. Vidal AU, Gessain A, Yoshida M, Mahieux R, Nishioka K, Tekaia F, et al. Molecular epidemiology of HTLV type I in Japan: evidence for two distinct ancestral lineages with a particular geographical distribution. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10(11):1557-66. <https://doi.org/10.1089/aid.1994.10.1557>
30. Vidal AU, Gessain A, Yoshida M, Tekaia F, Garin B, Guillemain B, et al. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus

- type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *J Gen Virol.* 1994;75(12): 3655-66.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3655>
31. Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol.* 1992;30:1605-7. doi: 10.1128/jcm.30.6.1605-1607.1992
 32. De-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, et al. HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol.* 1994;10:165-71. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01730366>
 33. Garin B, Gosselin S, de The G, Gessain A. HTLV-I/II infection in a high viral endemic area of Zaire, Central Africa: comparative evaluation of serology, PCR, and significance of indeterminate Western Blot pattern. *J Med Virol.* 1994;44:104-9. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890440119>
 34. Vallejo A, Garcia-Saiz A. Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: application to clinical specimens. *J Virol Methods* 1995;51: 9-18. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(94\)00093-V](https://doi.org/10.1016/0166-0934(94)00093-V)
 35. Soldan SS, Graf MD, Waziri A, Flerlage AN, Robinson SM, Kawanishi T, et al. HTLV-I/II seroindeterminate Western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. *J Infect Dis.* 1999; 180:685-694. doi: 10.1086/314923
 36. Poiesz BJ, Dube S, Choi D, Esteban E, Ferrer J, Leon-Ponte M, 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. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2000.40080924.x>
 37. Costa JMP, Sumita LM, Segurado AC. Non-radioisotope detection of pol sequences of HTLV-1 proviral DNA: Standardization

- and sensitivity analysis. *J Virol Methods* 2006;137: 29-33.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.026>
38. Costa JMP, 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 São Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2009;44:185-9. doi: 10.1016/j.jcv.2008.12.015
39. Matsumoto C, Mitsunaga S, Oguchi T, Motomi Y, Shimada T, Ichigawa A, et al. Detection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus in an infected cell line and in peripheral mononuclear cells of blood donors by the nested double polymerase chain reaction method: comparison with HTLV-I antibody tests. *J Virol.* 1990;64(11):5290-4. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC248573/pdf/jvirol00066-0068.pdf>
40. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Zandoná-Meleiro MC, Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, et al. Sensitivity of two ELISA tests in relation to western blot in detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;30(3):173-82. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(97\)00236-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(97)00236-8)
41. Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sen L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol.* 2004;74:323-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.20172>
42. 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 S. Paulo.* 2007;49(4):225-30. doi: 10.1590/s0036-46652007000400006
43. Zanjani DS, Shahabi M, Talaei N, Afzalaghæe M, Tehranian F, Bazargani R. Molecular analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1/2) seroindeterminate blood donors from

- Northeast Iran: Evidence of proviral tax, env, and gag sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011;27:131-5. doi: 10.1089/aid.2010.0017
44. Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of "nested" PCR products. *J Virol Methods* 1992;40:163-73. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(92\)90065-L](https://doi.org/10.1016/0166-0934(92)90065-L)
45. Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sem L, Medeot S. Usefulness of a nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. *Mem Inst Oswaldo Cruz, R Janeiro*. 2004;99(4):377-80. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400006>
46. Vallinoto ACR, Muto NA, Pontes GS, Machado LFA, Azevedo VN, Santos SEB, et al. Serological and molecular evidence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. *Jpn J Infect Dis*. 2004;57:156-9. <https://www.niid.go.jp/niid/images/JJID/57/156.pdf>
47. Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L, et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:371-6. doi: 10.1590/s0074-02762005000400006
48. Vallinoto ACR, Pontes GS, Muto NA, Lopes IG, Machado LF, Azevedo VN, et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated afro-brazilian quilombo located in the Marajó island (Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz, R Janeiro*. 2006;101:103-5. doi: 10.1590/s0074-02762006000100020
49. Souza LA, Lopes IGL, Maia EL, Azevedo VN, Machado LFA, Ishak MOG, et al. Caracterização molecular do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 em Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(5):504-6. <https://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v39n5/a17v39n5.pdf>

50. Berini CA, Eirin ME, Pando MA, Biglione MM. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *J Med Virol.* 2007;79: 69-73. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jmv.20731>
51. Casseb J, Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LMI, Olah I, Smid J, et al. T CD4+ cells count among patients co-infected with human Immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis / HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Rev Inst Med trop S. Paulo.* 2007; 49(4): 231-3. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000400007>
52. Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Vicente ACP, Hall WW, Ishak MOG. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect.* 2007;135: 604-9. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006984>
53. Zehender G, Ebranati E, Bernini F, De Maddalena C, Giambelli C, Collins J, et al. Phylogeny of human T cell lymphotropic virus type 1 in Peru: a high degree of evolutionary relatedness with South African isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23(9):1146-9. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0039>
54. Montanheiro P, Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Oliveira ACP, Kanzaki LIB, et al. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res.* 2008;135:22-5. doi:10.1016/j.virusres.2008.01.015
55. Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Penalva de Oliveira AC, Duarte AJS, Casseb J. Neither molecular diversity of envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. *J Med Virol.* 2010;82:837-42. <https://doi.org/10.1002/jmv.21718>
56. Costa EAS, Magri MC, Caterino-de-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in

- at risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2011; 173:280-3. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.02.018
57. De Oliveira EH, Oliveira-Filho AB, Souza LA, Silva LV, Ishak MOG, Ishak R, et al. Human T-cell lymphotropic virus in patients infected with HIV-1: molecular epidemiology and risk factors for transmission in Piauí, Northeastern Brazil. *Curr HIV Res*. 2012;10(8):700-7. doi: 10.2174/1570162x11209080700.
58. Berini CA, Eirin ME, Delfino CM, Weissenbacher M, Biglione MM. Predominance of human lymphotropic T cell virus type 2 subtype b in urban populations of Argentina. *AIDS Res Hum Retrovir*. 2012;28(9):1102-9. doi: 10.1089/AID.2011.0311
59. Costa CA, Furtado KCYO, Ferreira LSCF, Almeida DS, Linhares AC, Ishak R, et al. Familial transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2272. doi:10.1371/journal.pntd.0002272
60. Paiva A, Smid J, Haziot ME, Assone T, Pinheiro S, Fonseca LAM, et al. High risk of heterosexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in Brazil. *J Med Virol*. 2017;89:1287-94. <https://doi.org/10.1002/jmv.24745>
61. Vrieling H, Zaaijer HL, Cuypers HTM, van der Poel CL, Woerdeman M, Lelie PN, et al. Evaluation of a new HTLV-I/II polymerase chain reaction. *Vox Sang*. 1997;72:144-7. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1997.7230144.x>
62. Liu H, Shah M, Stramer SL, Chen W, Weiblen BJ, Murphy EL. Sensitivity and specificity of human T-lymphotropic virus (HTLV) types I and II polymerase chain reaction and several serologic assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. *Transfusion* 1999;39:1185-93. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39111185.x>
63. Césaire R, Dehée A, Lézin A, Désiré N, Bourdonné O, Dantin F, et al. Quantification of HTLV type I and HIV type 1 DNA load in coinfecting patients: HIV type 1 infection does not

- alter HTLV type I proviral amount in the peripheral blood compartment. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17(9):799-805. <https://doi.org/10.1089/088922201750251990>
64. Estes MC, Sevall JS. 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. doi:10.1016/S0890-8508(03)00002-1
65. Kamihira S, Dateki N, Sugahara K, Hayashi T, Harasawa H, Minami S, et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. *Clin Lab Haem*. 2003;25:111-7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2003.00503.x>
66. Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J Clin Virol*. 2004;31:275-82. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.05.016>
67. Murphy EL, Lee T-H, Chafets D, Nass CC, Wang B, Loughlin K, et al. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. *J Infect Dis*. 2004;190:504-10. <https://doi.org/10.1086/422398>
68. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-II-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res*. 2005;28:1643-7. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005001100011>
69. Olindo S, Lézin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Kaptue ME, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: A marker of disease progression. *J Neurol Sci*. 2005;237:53-9. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.05.010>
70. Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients

- with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirol.* 2005;2:4. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-4>
71. Best I, Adai V, Verdonck K, González E, Tipismana M, Clark D, et al. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(2):226-33. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03208.x <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19213697/>
72. Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC, Lemos JAR. HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real time PCR. *Rev Soc Bras Med Tropical S Paulo.* 2006;39(6):548-52. <https://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v39n6/07.pdf>
73. 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. doi:10.1186/1471-2334-6-41.
74. Arruda BC, Lira RA, Loureiro P, Brandão L, Souza P, Souza WV, et al. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in patients in the Hematologia da Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(5):384-9. <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/6HJQDg8PQHVMBDPKg8ffP3M/?format=pdf&lang=en>
75. Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation and quantification of human T-cell leukaemia viruses types 1, 2 and 3. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):1129-35. doi: 10.1128/JCM.02006-08 <https://jcm.asm.org/content/47/4/1129>
76. Primo PJ, Siqueira I, Nascimento MCF, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is

- also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(8):761-4. <https://www.scielo.br/j/bjmbr/a/6CsgkdrvPpBk93Y7PZ9rXSc/?lang=en&format=pdf>
77. Neto WK, Da-Costa AC, de Oliveira ACS, Martinez VP, Nukui Y, Sabino EC, et al. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among Human T cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. *Virol J.* 2011;8:535. <http://www.virologyj.com/content/8/1/535>
78. Waters A, Oliveira ALA, Coughlan S, de Venecia C, Schor D, Leite A-C, Araújo AQC, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. *J Clin Virol.* 2011;52(1):38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.05.022>
79. Cabral F, Arrudac LB, Araújo ML, Montanheiro P, Smid J, Oliveira ACP, et al. Detection of human T-cell lymphotropic virus type 1 in plasma samples. *Vir Res.* 2012;163:87-90. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.08.014>
80. Olavarria VN, Gomes AN, Kruschewsky RA, Bernardo Galvão-Castro B, Grassi MFR. Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(4):357-60. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.06.022>
81. Ribeiro MA, MD, Martins ML, Teixeira C, Ladeira R, Oliveira MF, Januário JH, et al. Blocking vertical transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 through breastfeeding interruption. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31:1139-43. doi: 10.1097/INF.0b013e318263215e.
82. Souza VG, Martins ML, Carneiro-Proietti ABF, Januário JN, Ladeira RVP, Silva CMS, et al. High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, State of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(2):159-62. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000200004>

83. Castro GM, Balangero MC, Maturano E, Mangeaud A, Gallego SV. Development and validation of a real-time PCR assay for a novel HTLV-1 tax sequence detection and proviral load quantitation. *J Virol Methods* 2013;189:383-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.02.018>
84. Abad-Fernández M, Cabrera C, García E, Vallejo A. Transient increment of HTLV-2 proviral load in HIV-1-co-infected patients during treatment intensification with raltegravir. *J Clin Virol*. 2014;59:204-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.12.010>
85. 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 Immunoassay Immunoch.* 2014;35(1):74-82. <https://doi.org/10.1080/15321819.2013.792832>
86. Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, Biglione M. Low proviral load is associated with indeterminate Western Blot patterns in human T-cell lymphotropic virus type 1 infected individuals: could punctual mutations be related? *Viruses*. 2015;7(11):5643-58. <https://doi.org/10.3390/v7112897>
87. Nasir IA, Ahmad AE, Emeribe AU, Shehu MS, Medugu JT, Babayo A. Molecular detection and clinical implications of HTLV-1 infections among antiretroviral therapy-naïve HIV-1-infected individuals in Abuja, Nigeria. *Virology: Research and Treatment* 2015;6:17-23. <https://doi.org/10.4137/VRT.S35331>
88. Vet JAM, Majithia AR, Marras SAE, Tyagi S, Dube S, Poiesz BJ, et al. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(11):6394-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6394>
89. Dehée A, Césaire R, Desiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, et al. Quantification of HTLV-1 proviral load by TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* 2002;102:37-51. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00445-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00445-1)

90. Moens B, López G, Adai V, González E, Kerremans L, Clark D, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous genotyping and human T-lymphotropic virus type 1, 2, and 3 proviral load determination. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3682-91. doi: 10.1128/JCM.00781-09
91. Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes 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. <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/6rTQ9jMdYwhGMkYL7vTVpzK/?format=pdf&lang=e>
92. Furtado MSBS, Andrade RG, Romanelli LCF, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB. Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. *J Med Virol.* 2012; 84:664-71. doi: 10.1002/jmv.23227
93. Rosadas C, Cabral-Castro MJ, Vicente ACP, Peralta JM, Puccioni-Sohler M. Validation of a quantitative real-time PCR assay for HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol Methods* 2013;193:536-41. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.040>
94. Kamihira S, Yamano Y, Iwanaga M, Sasaki D, Satake M, Okayama A, et al. Intra- and inter-laboratory variability in human T-cell leukemia virus type-1 proviral load quantification using real-time polymerase chain reaction assays: A multi-center study. *Cancer Sci.* 2010;101:2361-7. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01720.x>
95. Kuramitsu M, Okuma K, Nakashima M, Sato T, Sasaki D, Hasegawa H, et al. Development of reference material with assigned value for human T-cell leukemia virus type 1 quantitative PCR in Japan. *Microbiol Immunol.* 2018;62:673-6. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12644>

96. Gonçalves MG. Padronização e validação da PCR em tempo real para a detecção rápida e quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2. Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019; 158p. <https://pesquisa.bvsalud.org/ses/resource/pt/biblio-1051598>
97. Bandeira LM, Puga MAM, de Paula VS, Demarchi LHF, Lichs GGC, Domingos JA, *et al.* Use of synthetic oligonucleotides for determination of HTLV-1 proviral load by real-time PCR: a helpful alternative approach in the clinical management. *J Appl Microbiol.* 2020;129:768-74. doi:10.1111/jam.14646
98. Brunetto GS, Massoud R, Leibovitch EC, Caruso B, Johnson K, Ohayon J, *et al.* Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations. *J Neurovirol.* 2014;20(4):341-51. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13365-014-0249-3>
99. Hedberg ST, Eriksson L, Demontis MA, Mölling P, Sundqvist M, Taylor G, *et al.* Droplet digital PCR for absolute quantification of proviral load of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) types 1 and 2. *J Virol Methods.* 2018; 60:70-4. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.07.003>
100. Yurick D, Khoury G, Clememns B, Loh L, Pham H, Kedzierska K, *et al.* Multiplex droplet digital PCR assay for quantification of human T-cell leukemia virus type 1 subtype c DNA proviral load and T cells from blood and respiratory exudates sampled in a remote setting. *J Clin Microbiol.* 2019;57(2):e01063-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01063-18>
101. Gomes YCP. Determinação da acurácia do teste de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP) para a confirmação de infecção pelos vírus linfotrópicos para células t humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1/2). Dissertação (Mestrado em

- Ciências) – Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Rio de Janeiro, 2020; 72p.
102. Gomes Y, Caterino-de-Araujo A, Campos K, Gonçalves MG, Leite AC, Lima MA, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid and Accurate Confirmatory Diagnosis of HTLV-1/2 Infection. *Viruses* 2020;12:981 <https://doi.org/10.3390/v12090981>
103. De Giorgi V, Zhou H, Alter HJ, Allison RD. A microarray-based pathogen chip for simultaneous molecular detection of transfusion–transmitted infectious agents. *J Transl Med.* 2019;17:156 <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1905-4>
104. Norouzi M, Ghobadi MZ, Golmimi M, Mozhgani SH, Ghourchian H, Rezaee SA. Quantum dot-based biosensor for the detection of human T-lymphotropic virus-1. *Analytical Letters.* 2017;50(15):2402-11. <http://dx.doi.org/10.1080/00032719.2017.1287714>
105. Fani M, Rezayi M, Pourianfar HR, Meshkat Z, Makvandi M, Gholami M, et al. Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor based on a facile one-step electrochemical synthesis of rGO–PPy–(L-Cys)–AuNPs nanocomposite for the HTLV-1 oligonucleotide detection. *Biotechnology and Applied Biochemistry* June 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1973>
106. Becherer L , Hess JF, Frischmann S, Bakheit M, Nitschko H, Stinco S, et al. Point-of-care system for HTLV-1 proviral load quantification by digital mediator displacement LAMP. *Micromachines.* 2021;12:159. <https://doi.org/10.3390/mi12020159>
107. Machuca A, Soriano V. In vivo fluctuation of HTLV-I and HTLV-II proviral load in patients receiving antiretroviral drugs. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;24(2):189-93. <https://doi.org/10.1097/00126334-200006010-00017>
108. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K-I, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in Adult T-cell Leukemia. *Blood* 1996;88:3065-73. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.8.3065.bloodjournal8883065>

109. Ramirez E, Fernandez J, Cartier L, Villota C, Rios M. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Vir Res.* 2003;91:231-9. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00276-9
110. Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol.* 2007;81:5714-23. doi: 10.1128/JVI.02511-06
111. Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, et al. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer.* 2011;128:1335-43. <https://doi.org/10.1002/ijc.25450>
112. Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, et al. Proviral features of human T cell leukemia virus type 1 in carriers with indeterminate Western blot analysis results. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2838-49. doi: 10.1128/JCM.00659-17
113. Hashikura Y, Umeki K, Umekita K, Nomura H, Yamada A, Yamamoto I, et al. Infection of defective human T-lymphotropic virus type 1. *Hum Cell.* 2017;30(2):117-23. doi: 10.1007/s13577-016-0156-4.
114. Katsuya H, Islam S, Tan BJY, Ito J, Miyazato P, Matsuo M, , Inada Y, et al. The nature of the HTLV-1 provirus in naturally infected individuals analyzed by the viral DNA-capture-seq approach. *Cell Reports.* 2019;29:724-35. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.016
115. Campos KR, Caterino-de-Araujo A. Provirus Mutations of Human T-Lymphotropic Virus 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in HIV-1-Coinfected Individuals. *mSphere.* 2020 Sep 30;5(5):e00923-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00923-20>
116. Blanco S, Frutos MC, Balangero MC, Gallego SV. Human T-lymphotropic virus type 1 infection in absence of tax gene: A challenge for molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution* 2021;90:104765 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104765>

117. Caterino-de-Araujo A, Campos KR. Defective particles of human T-lymphotropic virus and negative results in molecular assays. *Infection, Genetics and Evolution* 2021; (submitted)
118. Castro-Costa CM, Carton H, Santos TJT. HTLV-I negative tropical spastic paraparesis. A scientific challenge. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001;59(2-A):289-94. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2001000200031>
119. Segurado ACC, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge MLSG, et al. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:329-33. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000300009>
120. Colin DD, Alcântara LCJ, Santos FLN, Uchôa R, Tavares-Neto J. Seroprevalence of human T cell lymphotropic virus infection and associated factors of risk in blood donors of Rio Branco city, AC, Brazil (1998-2001). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(6):677-83. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000600006>
121. Santos TJT, Costa CMC, Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J, Dooren SV, et al. Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(3):202-9. <https://www.scielo.br/j/bjid/a/rtbTvFnXS8dhwhtDS7bWDzr/?lang=en&format=pdf>
122. Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MAV, Galvão-Castro B, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22(10):953-9. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.953>
123. Pimenta FCF, Haddad SK, Medeiros Filho JG, Costa MJC, Diniz MFM, Fernandes MP, et al. Prevalence ratio of HTLV-1

- in nursing mothers from the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *J Hum Lact.* 2008;24(3):289-92. <https://doi.org/10.1177/0890334408316084>
124. Dal Fabbro MMFJ, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas GMB, et al. Infecção pelo HTLV 1/2: atuação no pré-natal como estratégia de controle da doença no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(2):148-51. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000200003>
125. Nascimento LB, Carneiro MAS, Teles SA, Lopes CLR, Reis NRS, Costa e Silva AM, et al. Prevalence of infection due to HTLV-1 in remnant quilombos in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(6):657-60. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000600009>
126. Martins ML, Santos AC, Namen-Lopes MS, Barbosa-Stancioli EF, Utsch DG, Carneiro-Proietti AB. Long-term serological follow up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. *J Med Virol.* 2010; 82:1746-53. doi: 10.1002/jmv.21881
127. Galetto LR, Lunge VR, Béria JU, Tietzmann DC, Stein AT, Simon D. Prevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus infection in Southern Brazilian HIV-positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014;30(9):907-11. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0210>
128. Martin F, Tagaya Y, Gallo R. Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO. *Lancet.* 2018;391: 1893–1894. doi:10.1016/S0140-6736(18)30974-7
129. International Retrovirology Association (IRVA). [Internet]. [Acesso em 11 jun 2021]. Disponível em: <https://htlv.net/>
130. Caterino-de-Araujo A. Dia Mundial do HTLV - 10 de Novembro. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2018; 77:e1751. http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial77_completa/1751.pdf

131. HTLV Channel. 2020 [Internet, Youtube]. [Acesso em 11 jun 2021] Disponível em: <https://www.youtube.com/channel/UCI6aLSTtk7chXMeybJ92Fhw>
132. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). 1ª edição. Brasília: MS; 2020. 248p.
133. Rosadas C, Brites C, Arakaki-Sanchez D, Casseb J, Ishak R. Brazilian Protocol for Sexually Transmitted Infections 2020: human T-cell lymphotropic virus (HTLV) infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2021;54(Suppl I): e2020605 <https://doi.org/10.1590/0037-8682-605-2020>
134. I WebSimpósio de HTLV - PCDT do HTLV: 2020 - Desafios e Perspectivas - Parte 1 [Internet]. Diagnóstico Laboratorial. [Acesso em 10 nov 2020]. Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=cdBeUrNmnE8&list=PLcprvSVJObvc6ij_-Ep3eLJPpPITfy0xN&index=2
135. Episódio 24 - Diagnóstico da Infecção de HTLV: Histórico e Desafios 2021. [Internet]. [Acesso em 20 abr 2021]. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=r2mpMuNmH6A>
136. World Health Organization (WHO). Human T-lymphotropic virus type 1: technical report. Geneva: WHO; 2021. 78p. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240020221>
-
-

Endereço para correspondência/correspondence to

Adele Caterino-de-Araujo
Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, São Paulo, SP., Brasil.
CEP: 01246-000
Telefone (11) 30682898
E-mail: adele.caterino@ial.sp.gov.br