

Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco

Lack in introducing a new algorithm of laboratorial tests for detecting HTLV-1 and HTLV-2 infections in at-risk population

RIALA6/1224

Emanuela Avelar Silva COSTA^{1,2}, Fabrício JACOB^{1,2}, Regiane dos Santos FELICIANO², Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA^{1,2}, Adele CATERINO-DE-ARAÚJO^{1,2*}

*Endereço para correspondência: Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: caterino@ial.sp.gov.br

¹Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências, São Paulo, SP, Brasil.

²Seção de Imunologia, Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 02.06.2009 Aceito para publicação: 26.08.2009

RESUMO

Em vista dos problemas detectados no diagnóstico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e -2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, foi proposto um novo algoritmo de testes laboratoriais que utiliza duas amostras de sangue seqüenciais. Na primeira o sangue é coletado em tubo seco e feita triagem sorológica com dois ensaios imunoenzimáticos (EIAs). Na segunda, o sangue é coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) para a repetição dos EIAs e para os testes confirmatórios de Western blot (WB) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos com 313 amostras de sangue mostraram ineficiência do algoritmo, pois nos casos EIA reagentes, apenas 25% tiveram uma segunda amostra de sangue coletada e destas, apenas três em EDTA. Portanto, não foi possível comparar o desempenho da PCR em relação ao WB. Um algoritmo simples, de coleta única de sangue em tubo contendo EDTA foi proposto e vem sendo utilizado para a triagem e para os testes confirmatórios.

Palavras-chave. vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1); vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2); diagnóstico; sorologia; ensaio imunoenzimático (EIA); Western blot (WB); reação em cadeia da polimerase (PCR); algoritmo de testes laboratoriais.

ABSTRACT

Taking into account the problems on the human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) laboratory diagnosis in samples analyzed at Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, it was proposed a new algorithm employing two blood samples serially collected. The first serum sample was for serological screening using two enzyme immunoassays (EIAs), and the second blood sample collected on EDTA was for retesting EIAs and to confirm HTLV-1/2 infection by Western blot (WB) and polymerase chain reaction (PCR). The results obtained on 313 blood samples showed inefficiency of this algorithm as only 25% of EIAs positive samples had a second blood sample collected, and of which the blood were correctly collected on EDTA from three patients only. No feasible data were achieved to compare the actual performance of PCR in relation to WB. Thus, we started to use a simple algorithm (one step) for diagnosing HTLV-1/2 on a single blood sample collected on EDTA for screening and confirmatory assays.

Key words. human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2); diagnosis; serology; enzyme immunoassay (EIA); Western blot (WB); polymerase chain reaction (PCR); algorithm tests.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) se baseia na pesquisa de anticorpos específicos no soro ou de segmentos de DNA proviral em células do sangue periférico. O algoritmo de testes laboratoriais recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil para HTLV-1 e HTLV-2 difere quando se trata de Laboratórios de Diagnóstico e Unidades de Hemoterapia. No primeiro caso, o Ministério da Saúde recomenda a pesquisa de anticorpos no soro usando um ensaio imunoenzimático (EIA) e em amostras reagentes, a repetição em duplicata do EIA antes de submeter o soro ao teste confirmatório de imunofluorescência indireta (IFI) ou Western blot (WB). Para os Hemocentros, o Ministério da Saúde não obriga a realização de teste confirmatório e os doadores de sangue cujos soros resultaram reagentes no EIA são encaminhados a Ambulatórios de Especialidades, para avaliação clínica e confirmação diagnóstica¹.

Desde novembro de 1998, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (IAL/CCD/SES-SP) vem realizando a sorologia para HTLV-1/2 em população de risco e tem observado problemas no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2²⁻⁶. O algoritmo adotado pelo Instituto Adolfo Lutz difere do recomendado pelo Ministério da Saúde, pois usa dois testes EIA de composição antigênica e formatos diferentes na triagem sorológica. Isto porque nenhum EIA disponível no comércio (1ª, 2ª ou 3ª geração) é capaz de detectar todos os casos verdadeiramente soropositivos para a infecção por HTLVs². Apesar da melhora na composição dos kits EIA que tem aumentado sua sensibilidade e especificidade, um grande número de soros com padrão indeterminado no teste confirmatório de WB continua sendo observado⁷⁻¹⁰. No Instituto Adolfo Lutz, cerca de 30% dos soros de população de risco apresenta perfil indeterminado à análise pelo WB³.

Recentemente, foi proposto um novo algoritmo de testes laboratoriais para ser usado pelo Instituto Adolfo Lutz (Figura 1)¹¹. Este algoritmo tomou como base o algoritmo proposto pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), onde são solicitadas duas amostras seqüenciais de sangue¹². Para o HTLV-1/2, a primeira amostra de sangue deve ser colhida em tubo seco e o soro testado quanto à presença de anticorpos específicos por

dois EIAs. Em soros reagentes em pelo menos um EIA, uma segunda amostra de sangue deve ser solicitada e o sangue coletado em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Nesta amostra de sangue, o plasma é usado para repetir a triagem sorológica (dois EIAs) e nos casos reagentes, os soros submetidos ao ensaio de WB. A fração de células do sangue periférico (PBL) é utilizada para a pesquisa de segmentos de DNA de HTLV-1/2 (região *tax* do genoma proviral) pela reação em cadeia da polimerase (PCR)¹³⁻¹⁵. Os produtos da PCR são analisados quanto a fragmentos de restrição enzimática (PCR-RFLP) usando a enzima *Taq* I que apresenta sítio em fragmento *tax* de HTLV-2 e, portanto, discrimina HTLV-1 de HTLV-2. Esta estratégia de coleta seqüencial de sangue evita resultados falsos (positivo e negativo) por falha humana de identificação e / ou manuseio das amostras de sangue e, possibilita comparar o desempenho do WB em relação à PCR em população de risco.

Um estudo preliminar usando este algoritmo foi realizado com 313 amostras de soro recentemente encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise. As amostras eram provenientes de Centros de Referência e Treinamento em AIDS (14,4%) e de Ambulatórios de Especialidades do SUS (85,6%). Das 313 amostras de soro analisadas, 36 resultaram pelo menos um EIA reagente (11,5%) sendo requisitada nova coleta de sangue à respectiva unidade de origem dos pacientes. Uma segunda amostra de sangue foi coletada somente de 9 (25%) pacientes, sendo que em apenas três (33%) pacientes o sangue foi coletado corretamente. Isto mostrou ineficiência do algoritmo proposto, não havendo entrosamento entre Laboratório, Unidade solicitante, médico e paciente. No entanto, os pacientes tiveram seus soros analisados pelo teste confirmatório de WB e 35% deles resultaram WB indeterminados, mostrando a necessidade de se implantar a PCR para a confirmação de infecção por HTLV-1/2. Infelizmente, o pequeno número de amostras de PBL (três) não permitiu comparar os resultados do WB com os da PCR. Porém este estudo mostrou que o algoritmo proposto, embora útil em pesquisa, é totalmente inadequado para ser usado na rotina diagnóstica e ele foi substituído por um algoritmo mais simples, de etapa única, onde o sangue é coletado em tubo contendo EDTA e usado para a triagem sorológica e para os testes confirmatórios (2ª etapa da Figura 1). Estudos futuros poderão mostrar a eficácia deste novo algoritmo para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 em população de risco de São Paulo e mensurar custo/

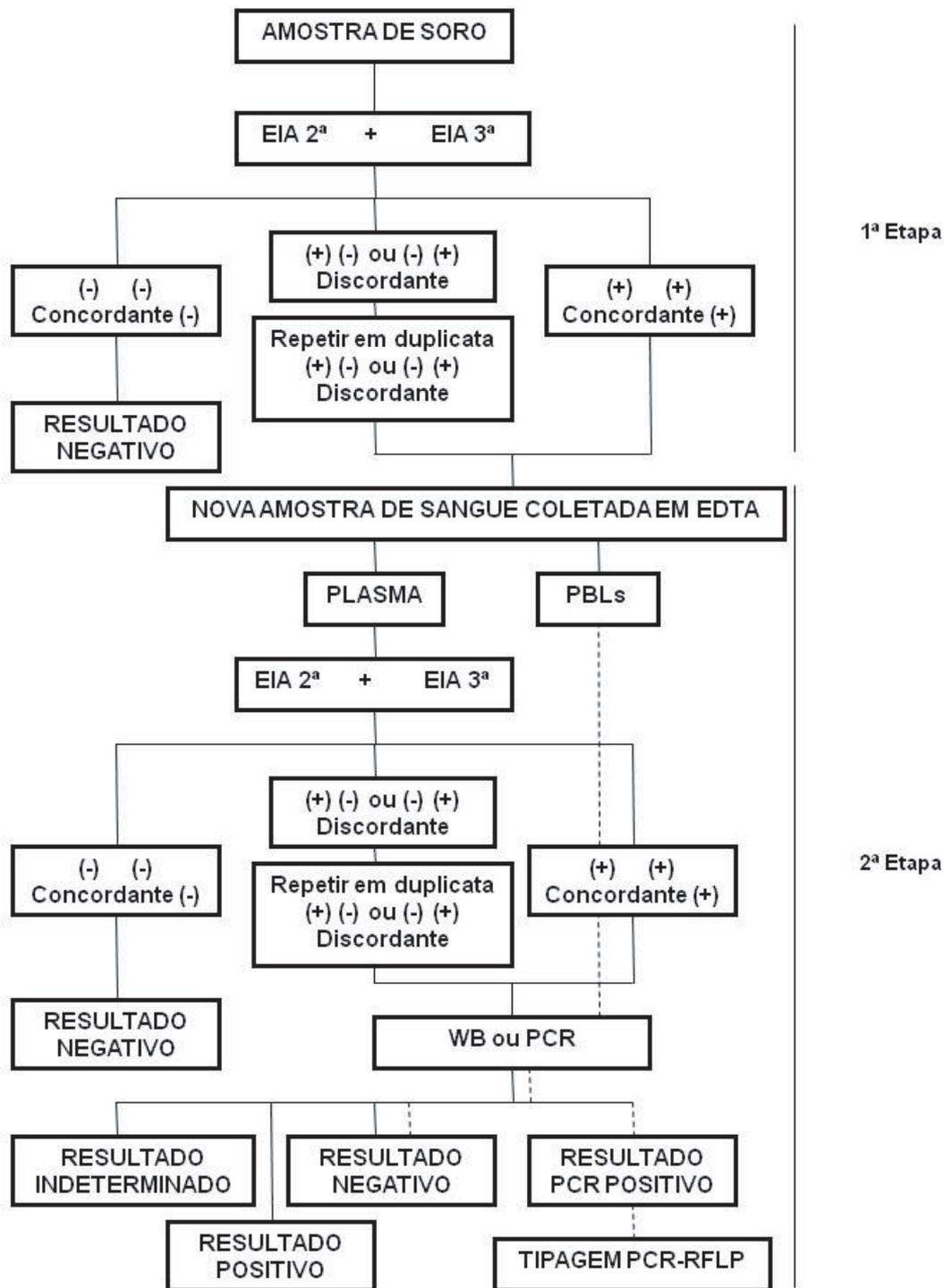


Figura 1. Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 utilizado pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Legenda: +: soro reagente; -: soro não reagente; EIA: ensaio imunoenzimático; EIA 2ª: EIA de segunda geração; EIA 3ª: EIA de terceira geração; PBL: células do sangue periférico; WB: Western blot; PCR: reação em cadeia da polimerase; PCR-RFLP: análise de produto de PCR por polimorfismo de restrição enzimática.

benefício dos testes confirmatórios de PCR e WB. Há que se ressaltar o alto custo do kit disponível no mercado de WB (WB 2.4, Genelabs Diagnostic, Singapore), cujo custo aproximado é de US\$ 240,00 por tira, e o alto número de soros com padrão indeterminado para a infecção por HTLV-1/2 ao se utilizar este kit.

O conhecimento do real status de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 é importante para direcionar a conduta clínica e terapêutica do paciente¹⁶. O HTLV-1 está relacionado com doenças graves como a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 e a leucemia de células T do adulto, enquanto o HTLV-2 é reconhecidamente menos patogênico¹⁷. Portanto, o diagnóstico diferencial é de suma importância. Além disto, em países onde o HTLV-1 e o HTLV-2 são endêmicos e onde os isolados virais podem divergir dos isolados empregados na composição dos kits utilizados na detecção de anticorpos específicos⁷, há necessidade de se verificar qual o melhor teste confirmatório para ser usado no diagnóstico. Estudos de novas metodologias e algoritmos de diagnóstico são importantes para a saúde pública e são desafios que se impõem à Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz.

Suporte: Bolsas de Mestrado CAPES para EASC e FJ; Bolsa PAPS/SP para RSF; Bolsa de Produtividade em Pesquisa MCT/CNPq para ACA # 304372/2006-4; Auxílio Financeiro CCD-SES/SP, MCT/CNPq Universal # 481040/2007-2 e IAL # 33/07.

Trabalho parcialmente apresentado na 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. Salvador, Ba, July 1 – 4, 2009.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. HTLV-I/II - Triagem e diagnóstico sorológico em Unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998. II (Série TELELAB); 54p.
2. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*. 2007; 49: 361-4.
3. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008; 42: 149-55.
4. Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista. 2008; 5: 12-8.
5. 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.
6. 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*. 2009;156: 150-1.
7. Mahieux R, Horal P, Mauclère P, Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Meertens L, Murphy E, Gessain A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 gag indeterminate Western blot patterns in Central Africa: relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 4049-57.
8. 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.
9. Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, Caterino-de-Araujo A. 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.
10. 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.
11. Jacob F. Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise. [Dissertação de Mestrado] São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2007. 103 pp.
12. Ministério da Saúde. Portaria nº 34, de jul. 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 29 de jul. 2005. Procedimentos seqüenciados para realização do diagnóstico da infecção pelo HIV utilizando-se testes rápidos em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses. [Regulamenta o uso de testes rápidos para diagnóstico da infecção pelo HIV em situações especiais].
13. 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.
14. Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sen 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*. 2004; 99(4): 377-80.
15. Gudo ES, Abreu CM, Mussá T, Augusto AR, Otsuki K, Chambo E, Amade N, Tanuri A, Ferreira OC, Jani IL. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo city, Mozambique. *Transfusion*. 2008; 49(6): 1146-50.
16. Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. *Braz J Med Biol Res*. 2000; 33: 1395-401.
17. Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP, Sanabani S, Marchiori PE, Duarte AJS, Penalva-de-Oliveira AC. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated myelopathy development in HTLV-1-infected subjects in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(3): 273-6.