



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) TIPOS 1 E 2 POR
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES EM AMOSTRAS
DE SANGUE DE GESTANTES**

MARIA DE FÁTIMA CASTRO MENDES

São Luís – MA

2020

MARIA DE FÁTIMA CASTRO MENDES

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) TIPOS 1 E 2 POR
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES EM AMOSTRAS
DE SANGUE DE GESTANTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim.

São Luís – MA

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Mendes, Maria de Fátima Castro.

Determinação da prevalência de infecção pelo Vírus Linfotrófico de células T Humanas HTLV tipos 1 e 2 por métodos sorológicos e moleculares em amostras de sangue de gestantes / Maria de Fátima Castro Mendes. - 2020.
97 f.

Orientador(a): Maria Rosa Quaresma Bomfim.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2020.

1. Gestante. 2. HTLV. 3. PCR. 4. Prevalência. 5. Sorologia. I. Bomfim, Maria Rosa Quaresma. II. Título.

MARIA DE FÁTIMA CASTRO MENDES

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) TIPOS 1 E 2 POR
MÉTODOS SOROLÓGICOS E MOLECULARES EM AMOSTRAS
DE SANGUE DE GESTANTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim - Orientadora

Universidade Ceuma

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

4° Examinador

“Se não houve frutos ...

Valeu a beleza das flores ...

Se não houve flores ...

Valeu a sombra das folhas ...

Se não houve folhas ...

Valeu a intenção das sementes ...”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, força e sabedoria para vencer os obstáculos encontrados no decorrer desta jornada.

À minha família, em especial, aos meus pais João Batista e Maria de Jesus, e aos meus sobrinhos Davi Emanuel e Gustavo Mendes que estavam sempre ao meu lado me dando carinho, amor e apoio para prosseguir.

À minha orientadora, professora Dra. Maria Rosa Quaresma Bomfim, por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos constantes e pelo incentivo em momentos difíceis. Além da minha admiração pessoal e profissional.

Ao Dr. José de Ribamar Oliveira Lima, pela confiança, amizade e por ter me convidado a participar desta pesquisa.

Aos amigos Bruna de Oliveira, Hermerson Sousa, Ozana Martins e Telma de França, pela boa convivência, e pela grande contribuição no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos colegas e amigos do LACEN-MA, em particular, as assistentes sociais Mary Lucy Torres e Ana Regina Costa pela ajuda nas entrevistas com as gestantes, e ao senhor Antônio José pela realização dos testes sorológicos para o HTLV.

A todas as gestantes que aceitaram participar deste estudo, pois sem elas não chegaríamos a lugar nenhum.

Ao LACEN-MA, pela infraestrutura e suporte oferecidos para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Universidade CEUMA, pelo suporte para a realização dos testes moleculares para o HTLV.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA, pelo apoio financeiro.

À Pós-Graduação em rede BIONORTE pela oportunidade de aprendizagem.

A todos o meu muito obrigada!!!

MENDES, Maria de Fátima Castro. **Determinação da prevalência de infecção pelo Vírus Linfotrópico de células T Humanas (HTLV) tipos 1 e 2 por métodos sorológicos e moleculares em amostras de sangue de gestantes**, 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 97f.

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um retrovírus que está associado a vários tipos de doenças: hematológicas, imunológicas, dermatológicas, oftalmológicas, neurológicas e urológicas. O aleitamento materno é a principal via de transmissão do HTLV-1/2 da mãe para o filho. O presente estudo teve por objetivo investigar por métodos sorológicos e moleculares a prevalência de infecção pelo HTLV-1/2 em gestantes, nas faixas etárias de 15 a 45 anos de idade, atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA). Realizou-se um estudo transversal com 713 gestantes que foram entrevistadas e cederam espontaneamente amostras de sangue para serem triadas por Imunoensaio Quimioluminescente com micropartícula (CMIA) para a determinação qualitativa de anticorpos anti-HTLV-1/2, e teste de *Western blot* (WB) HTLV-1/2 para a confirmação de resultados reativos. O material genético foi extraído das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de todas as 713 amostras, e submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com iniciadores específicos, especialmente desenhados para este estudo. Os dados sociodemográficos e epidemiológicos das gestantes investigadas revelaram que a idade variou de 15 a 43 anos, com média de $24,3 \pm 6,2$ anos, com o predomínio da etnia parda (63,8%); 95,2% eram da área metropolitana de São Luís; 71,8% eram casadas/união estável; 61,7% tinham escolaridade igual ou superior ao ensino médio completo; 53,7% relataram atividades domésticas; 56,9% tiveram gestações prévias; 72,0% tinham renda familiar de 1 a 3 salários mínimos, e 49,6% dos domicílios eram constituídos de 1 a 3 pessoas. Quanto aos fatores de risco para a ocorrência de infecção pelo HTLV observou-se que 55% dos parceiros das gestantes às vezes utilizavam preservativos; 9% delas não tinham parceiro sexual fixo; em 3,6%, o parceiro era usuário de droga injetável; 4,6% foram submetidas à transfusão sanguínea, e 66,7% das mulheres com gestação prévia amamentaram por mais de seis meses. Nas amostras de sangue triadas sorologicamente por CMIA foram encontrados 5 soros reativos para HTLV-1/2. Após confirmação pelo WB, constatou-se que 3 (0,42%) eram positivos para o HTLV-1, enquanto 2 apresentaram resultados indeterminados. As amplificações por PCR confirmaram que as 5 amostras reativas por CMIA foram também positivas para o HTLV-1 por PCR. Os resultados do CMIA e da PCR demonstraram uma prevalência de 0,7% de HTLV-1 em gestantes da região metropolitana de São Luís, colocando a capital maranhense entre as capitais com maior prevalência de HTLV-1 no Brasil nessa população. A somatória dos resultados demonstrou a necessidade da adoção de políticas públicas de prevenção e controle desta infecção, entre as quais tornar obrigatória a triagem do HTLV-1/2 no pré-natal, a adoção de medidas educativas para a população e profissionais de saúde no sentido do aconselhamento a não amamentação em casos de mães infectadas, e tornar essa infecção de notificação compulsória.

Palavras – chave: HTLV. Gestante. Prevalência. Sorologia. PCR.

MENDES, Maria de Fátima Castro. **Determination of the prevalence of Human T-cell Lymphotropic Virus (HTLV) 1 and 2 infection by serological and molecular methods in pregnant women blood samples**, 2019. Thesis (PhD in Biotechnology) – Federal University of Maranhão, São Luís, 97f.

ABSTRACT

The human T-cell lymphotropic virus (HTLV) is a retrovirus that is associated with several types of diseases: hematological, immunological, dermatological, ophthalmologic, neurological, and urologic. Breastfeeding is the main way of HTLV-1/2 transmission from mother to child. The present study aimed to investigate, through serological and molecular methods, the prevalence of HTLV-1/2 infections in pregnant women aged 15-45 years, attended at the Central Public Health Laboratory of Maranhão (LACEN-MA). A cross-sectional study was conducted with 713 pregnant women who spontaneously gave blood samples to be screened by Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) for the qualitative determination of anti-HTLV-1/2 antibodies, and Western blot test (WB) HTLV-1/2 for the confirmation of reactive results. The genetic material was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of all 713 samples and subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific primers specifically designed for this study. Sociodemographic and epidemiological data of the pregnant women investigated revealed that the age ranged from 15 to 43 years, with an average of 24.3 ± 6.2 years, with a predominance of the mulattos ethnic group (63.8%); 95.2% were from the metropolitan area of São Luís; 71.8% were married or in stable union; 61.7% had completed schooling equal to or superior to high school education; 53.7% reported domestic activities; 56.9% had previous pregnancies; 72.0% had a family income of 1 to 3 minimum wages, and 49.6% of the households were made up of 1 to 3 people. Regarding the risk factors for the occurrence of HTLV infection, it was observed that 55% of the partners of pregnant women sometimes used condoms; 9% of them had no fixed sexual partner; in 3.6%, the partner was an injecting drug user; 4.6% were submitted to blood transfusion, and 66.7% of women with previous pregnancies breastfed for more than six months. In blood samples serologically screened by CMIA, 05 sera were found HTLV-1/2 reactive. After confirmation by WB, it was found that 3 (0.42%) were positive for HTLV-1, while 2 presented indeterminate results. PCR amplification confirmed that the 5 CMIA reactive samples were also positive for HTLV-1 by PCR. The results of CMIA and PCR showed a prevalence of 0.7% of HTLV-1 in pregnant women in the metropolitan region of São Luís, placing the capital of Maranhão among the capital with the highest prevalence of HTLV-1 in Brazil in this population. The sum of the results points to the need of taking public policies for the prevention and control of this infection, including making it compulsory to screen HTLV-1/2 in prenatal care, adopting educational measures for the population and health professionals in the sense of counseling not breastfeeding in cases of infected mothers, and making such infection of compulsory notification.

Keywords: HTLV. Pregnant women. Prevalence. Serology. PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CMIA	Imunoensaio Quimioluminescente com micropartículas, do inglês <i>“Chemiluminescent Microparticle Immunoassay”</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético, do inglês <i>“Ethylenediamine tetraacetic acid”</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	Giros
GLUT-1	Receptor transportador de glicose
HBZ	HTLV-1 <i>basic leucine zipper factor</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>“Human immunodeficiency virus”</i>
HTLV	Vírus Linfotrópico de células T Humanas, do inglês <i>“Human T-cell lymphotropic virus”</i>
LACEN-MA	Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão
LLTA	Leucemia/ Linfoma de células T do Adulto
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês <i>“Peripheral blood mononuclear cells”</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato, do inglês <i>“Phosphate buffered saline”</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>“Polymerase chain reaction”</i>
PET/ MAH	Paraparesia espástica tropical/ Mielopatia associada ao HTLV-1
PTLV	Vírus Linfotrópico de células T de Primatas, do inglês <i>“Primate T-cell lymphotropic virus”</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
STLV	Vírus Linfotrópico de células T de Símios, do inglês <i>“Simian T-cell lymphotropic virus”</i>
<i>tax</i>	Gene regulador de transativação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
WB	<i>Western blot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Vírus Linfotrópico de células T Humanas (HTLV).....	13
2.1.1	Aspectos estruturais e genômicos do HTLV.....	14
2.1.2	Ciclo de replicação do HTLV.....	16
2.1.3	Vias de transmissão do HTLV.....	18
2.2	Aspectos epidemiológicos do HTLV.....	20
2.2.1	Distribuição geográfica do HTLV-1/2.....	20
2.2.1.1	<i>Subtipos do HTLV-1/2 e suas distribuições geográficas.....</i>	<i>21</i>
2.2.2	Epidemiologia do HTLV-1/2 no Brasil.....	21
2.2.3	Infecção pelo HTLV- 1/2 e doenças associadas.....	24
2.2.4	Diagnóstico laboratorial e tratamento do HTLV- 1/2.....	27
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Geral.....	32
3.2	Específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.	33
4.1	Aspectos éticos.....	33
4.2	Tipo, período e amostra do estudo.....	33
4.3	Coleta de dados e amostras.....	33
4.4	Processamento e análise das amostras.....	34
4.4.1	Triagem sorológica.....	34
4.4.2	Extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	34
4.4.2.1	<i>Extração de DNA proviral das amostras de PBMC e reações de PCR....</i>	<i>35</i>
4.5	Sequenciamento do fragmento amplificado para o HTLV-1.....	36
4.5.1	Análise computacional das sequências.....	36
4.6	Análises estatísticas.....	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Artigo Científico.....	38
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
	APÊNDICE B – Questionário Estruturado.....	71

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	74
ANEXO B – Normas da Revista.....	76

1 INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV) são patógenos classificados dentro da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus* do tipo C (ICTV, 2013), sendo conhecidos atualmente quatro sorotipos, HTLV-1 ao 4 (SZCZYPINSKA et al., 2015). Os HTLV-1 e 2 estão envolvidos com infecções e doenças em seres humanos, enquanto que, os HTLV-3 e 4 ainda não foram correlacionados com doenças em humanos, apesar de terem sido detectados e isolados a partir de populações da África Central (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005; SZCZYPINSKA et al., 2015).

Diferentes rotas de infecção têm sido descritas para o HTLV-1/2, dentre as quais: relação sexual desprotegida, transfusão sanguínea ou uso de hemoderivados, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas, doação de órgãos e tecidos, e da mãe para o filho (transmissão vertical), que pode ocorrer pela via transplacentária, durante o parto ou pelo aleitamento materno (GESSAIN; CASSAR, 2012). Porém, o aleitamento materno prolongado é a principal via de transmissão vertical do HTLV (HINO, 2011; ROSADAS et al., 2019). Períodos prolongados de amamentação aumentam a probabilidade de contrair a infecção (GESSAIN; CASSAR, 2012; PAIVA et al., 2018).

Atualmente, o HTLV-1 é o mais prevalente e está ativamente envolvido na disseminação da infecção em aproximadamente 5 a 10 milhões de pessoas no mundo (GESSAIN; CASSAR, 2012). No Brasil, o HTLV-1 foi descrito pela primeira vez em 1986 em uma comunidade de imigrantes japoneses e seus descendentes que residiam em Campo Grande (Mato Grosso do Sul), sendo a maioria dos indivíduos provenientes do sul do Japão (área endêmica para HTLV) (KILTAGAWA et al., 1986). Estima-se que aproximadamente 800.000 brasileiros estejam infectados pelo HTLV-1 (GESSAIN; CASSAR, 2012), com o vírus presente em populações de todas as regiões, com prevalências variadas (CATALAN-SOARES et al., 2005; GESSAIN; CASSAR, 2012).

O indivíduo infectado pelo HTLV-1 pode desenvolver doenças graves como a leucemia/ linfoma de células T do adulto (LLTA) ou a paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH), que é uma inflamação neurológica

crônica e incapacitante caracterizada por lesões desmielinizantes no cérebro e na medula espinhal (VERDONCK et al., 2007). É importante salientar que na infecção pelo HTLV-1 aproximadamente 90% dos indivíduos infectados permanecem como portadores assintomáticos por toda a vida, enquanto, 10% destes indivíduos podem desenvolver complicações clínicas graves como LLTA e PET/MAH (GONÇALVES et al., 2010; ROSADAS; TAYLOR, 2019). Ressalta-se que, a aquisição da infecção no início da vida pode levar ao aparecimento das doenças associadas ao HTLV-1 (ROSADAS; TAYLOR, 2019).

Com relação às infecções causadas pelo HTLV-2, elas são endêmicas em ameríndios nativos das Américas, em pigmeus de tribos da África e em usuários de drogas injetáveis dos Estados Unidos, Europa e América Latina, sendo o sorotipo mais prevalente entre as populações indígenas brasileiras (PAIVA; CASSEB, 2015). O Brasil é considerado o país com o maior número absoluto de infectados pelo HTLV-1/2 no mundo, levando-se em consideração a sua extensão territorial e a sua população (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002a; PINTO et al., 2012; PINTO et al., 2016).

Diferentemente do HTLV-1, o HTLV-2 não apresenta manifestações clínicas definidas, sendo associado a raros casos de distúrbios neurológicos semelhantes a PET/MAH e a infecções pulmonares crônicas (PAIVA; CASSEB, 2015; SZCZYPINSKA et al., 2015). No entanto, ambos têm a capacidade de se integrar ao DNA da célula infectada, tornando-se assim, um provírus (SABINO; CARVALHO, 2015).

As características epidemiológicas de soroprevalência do HTLV podem variar de acordo com a área geográfica, grupo étnico e comportamento de risco individual (NASCIMENTO et al., 2009). Além disso, a infecção causada pelo HTLV apresenta características peculiares como a presença de agrupamentos de genótipos em determinadas áreas geográficas, e aumento de prevalência, na maioria das áreas endêmicas para o HTLV-1, de acordo com a idade, condições socioeconômicas e sexo (maior ocorrência em mulheres) (GESSAIN; CASSAR, 2012; BRASIL, 2013).

A infecção pelo HTLV é um problema de saúde pública negligenciado e pouco conhecido pela maioria da população brasileira. Dados da literatura demonstraram que São Luís é uma das cidades brasileiras que apresenta uma das maiores

prevalências de infecção pelo HTLV-1/2 entre doadores de sangue no Brasil (CATALAN-SOARES et al., 2005). Entretanto, uma das principais vias de transmissão, em áreas endêmicas como o Brasil, é da mãe para o filho, por meio do aleitamento materno prolongado. Apesar da infecção pelo HTLV ser uma infecção sexualmente transmissível, não ter cura e estar associada ao desenvolvimento de alterações patológicas, que incluem doenças neoplásica, oftalmológica, dermatológica e neurológica, o Ministério da Saúde do Brasil não preconiza a triagem sorológica do HTLV-1/2 no pré-natal das gestantes. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar por métodos sorológicos e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a prevalência de infecção pelo HTLV-1/2 em gestantes, oriundas de diferentes municípios maranhenses, atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus Linfotrópico de células T Humanas (HTLV)

O HTLV é intimamente relacionado a retrovírus encontrados em primatas não humanos no velho mundo (STLV- vírus linfotrópico de células T de símios), fazendo parte do grupo denominado PTLV (vírus linfotrópico de células T de primatas) (KROON; PROIETTI, 2015). Os HTLV-1, 2 e 3 possuem correspondentes símios (STLV-1, 2 e 3, respectivamente), sendo que apenas o HTLV-4 ainda não possui correspondente símio (WOLFE et al., 2005).

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus oncogênico identificado em humanos (GESSAIN; CASSAR, 2012), sendo isolado pela primeira vez nos Estados Unidos, em 1980, a partir de linfócitos de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980). “In vitro”, o HTLV-1 pode infectar vários tipos de células humanas, tais como linfócitos (B e T), monócitos, fibroblastos (MANEL et al., 2003), células epiteliais e células gliais (FEUER; GREEN, 2005). Entretanto, “in vivo” apresenta maior tropismo por linfócitos T CD4+ (FEUER; GREEN, 2005; CAMPBELL et al., 2014), e em apenas 10% dos casos ele pode ser encontrado infectando linfócitos T CD8+ e NK (YASUNAGA et al., 2001; FEUER; GREEN, 2005).

Estudos sugerem que o HTLV-1 teve sua origem na África pela transmissão interespécies, a partir do contato entre humanos e primatas não humanos infectados, ocorrendo disseminação ao novo mundo (Estados Unidos, Caribe e América do Sul) por meio do tráfico de escravos africanos no século XVI (GESSAIN; GALLO; FRANCHINI, 1992; SONG et al., 1995). Existem ainda mais duas hipóteses para a disseminação do HTLV-1 nas Américas: a primeira seria pela imigração, na era paleolítica, pelo Estreito de Bering e a segunda pela imigração japonesa, de áreas endêmicas, no século XX (PAIVA; CASSEB, 2015).

O HTLV-2 foi isolado e identificado em 1982 a partir de linfócitos de um paciente com tricoleucemia (leucemia de células pilosas) (KALYANARAMAN et al., 1982). Este vírus apresenta maior tropismo por linfócitos T CD8+, mas pode ser encontrado infectando células T CD4+ (FEUER; GREEN, 2005; KANNIAN et al., 2012). A sua disseminação entre as populações das Américas teria ocorrido somente através da imigração pelo Estreito de Bering (PAIVA; CASSEB, 2015).

O HTLV-3 foi isolado do sangue de três pigmeus que residiam em um local remoto na floresta tropical do Sul de Camarões e tinham tido contato com primatas não humanos (CALATTINI et al., 2005). A análise "in vitro" das propriedades moleculares da proteína Tax do HTLV-3 revelou funcionalidade semelhante ao da proteína Tax do HTLV-1, sugerindo que o HTLV-3, assim como HTLV-1, pode ser patogênico "in vivo" (MOENS et al., 2009). Enquanto HTLV-4 foi isolado de um caçador que capturava macacos, gorilas e chimpanzés (WOLFE et al., 2005). Contudo, ainda não há relatos da associação dos HTLV-3 e 4 com doenças em populações humanas nem o conhecimento dos mecanismos de transmissão entre seres humanos (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005; SZCZYPINSKA et al., 2015). Nesse sentido, mais pesquisas são necessárias para determinar a distribuição, a prevalência e a patogenicidade destes dois novos genótipos de HTLV (MOENS et al., 2009).

2.1.1 Aspectos estruturais e genômicos do HTLV

Similarmente a outros retrovírus, o HTLV apresenta uma estrutura altamente polimorfológica, com diâmetro médio de 113 nanômetros, constituída por um envelope de esférico a pleomórfico, composto por duas camadas de proteolípidos provenientes da membrana plasmática da célula do hospedeiro. No envelope estão acopladas glicoproteínas de superfície (gp46) e transmembrana (gp21). Internamente localizam-se as proteínas da matriz (p19) e do capsídeo icosaédrico (p24). Na região central (nucleocapsídeo) existem duas moléculas idênticas, com polaridade positiva, lineares e de cadeia simples, mas não complementares de ssRNA⁺; e proteínas como protease, integrase, RNase H e transcriptase reversa (CAO et al., 2015; KROON; PROIETTI, 2015).

O genoma do HTLV possui regiões repetidas de cadeia longa terminais (*Long Terminal Repeat* - LTR) em ambas as extremidades (3' e 5'), os genes *gag* que codificam as proteínas do core (p19, p24 e p15), *pol* (protease, polimerase, integrase) e *env* que codifica as proteínas do envelope (gp 46 e gp21). A região LTR não apresenta função codificadora, porém suas sequências são fundamentais na integração do DNA proviral e expressão no DNA cromossômico do hospedeiro. De maneira geral, os retrovírus apresentam estrutura genômica com LTR-*gag-pol-env*-

LTR ou LTR- δgag - onc - δenv -LTR. No entanto, uma das características do HTLV é a presença da região pX localizada entre o gene *env* e a região 3' - LTR (LTR-*gag-pol-env*-pX-LTR) que é responsável pela codificação de diferentes proteínas regulatórias, entre as quais as proteínas Tax, Rex e HBZ (HTLV-1 *basic leucine zipper factor*) (MANEL et al., 2003; MATSUOKA, 2005).

O gene *tax* exerce papel central na transcrição, replicação e proliferação do HTLV nas células infectadas. Este gene melhora a transcrição viral a partir da região 5'-LTR pela interação a AMP cíclica (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico), além disso promove a proliferação de células infectadas, principalmente linfócitos T CD4+ e inibe a apoptose celular. O gene *rex* é responsável pela síntese de proteínas estruturais do vírus (MATSUOKA, 2005). O gene *HBZ* atua como antagonista de muitas atividades de *tax*, estimula a proliferação de células infectadas e suprime a apoptose, estando relacionado com a patogênese da infecção pelo HTLV (PANFIL et al., 2018).

A região *tax* do HTLV é a mais conservada, enquanto a região LTR é a que possui maior variabilidade no genoma viral (SANTOS; LIMA, 2005). Devido a esta variabilidade, a região LTR é utilizada para subtipar o HTLV-1 e o HTLV-2. Esta heterogeneidade genética traz informações epidemiológicas valiosas a respeito da transmissão e da distribuição geográfica destes vírus (BRASIL, 2013).

Ainda não está claro porque a infecção pelo HTLV-1 é mais patogênica do que a causada pelo HTLV-2. Tem sido sugerido que essa diferença poderia estar relacionada com a atividade das proteínas Tax. A proteína Tax é capaz de modular a expressão de genes celulares e virais, além de estar associada ao desencadeamento de patologias (FEUER; GREEN, 2005). Análises "in vitro" das propriedades moleculares da proteína Tax do HTLV-3 revelou funcionalidade semelhante à da proteína Tax do HTLV-1, sugerindo que o HTLV-3, assim como HTLV-1, pode ser patogênico "in vivo" (MOENS et al., 2009).

Os HTLV-1 e 2 possuem uma estrutura genômica semelhante, apresentando similaridade genética em aproximadamente 70% de seus nucleotídeos, variando de acordo com a região gênica avaliada (MELAMED et al., 2014; MARTIN et al., 2016). Com relação aos genes *gag*, *env* e *tax* a semelhança é de 85%, 65%, e 78%, respectivamente (FEUER; GREEN, 2005). Existe similaridade também quanto ao tamanho do DNA proviral inserido na célula infectada, onde o HTLV-1 possui 9.032

pares de base (pb) (SEIKI et al., 1983) e o HTLV-2 possui 8.952 pb (SHIMOTOHNO et al., 1985).

Quanto ao aspecto molecular, o HTLV-1 apresenta uma estabilidade genética ao longo dos tempos, possivelmente devido à sua proliferação viral, que ocorre principalmente por expansão clonal de células infectadas, ao invés de transcrição reversa, sendo esta uma característica rara para um retrovírus (GESSAIN; GALLO; FRANCHINI, 1992; GESSAIN; CASSAR, 2012). Esta baixa variabilidade genética pode servir como ferramenta molecular para adquirir mais conhecimentos sobre a origem, evolução e vias de disseminação desses retrovírus e de seus hospedeiros (GESSAIN; GALLO; FRANCHINI, 1992; GESSAIN; CASSAR, 2012).

O conhecimento do genoma do HTLV e das funções de seus genes são essenciais para definir semelhanças entre os tipos e subtipos virais, que variam de acordo com a área analisada. Além de favorecer o entendimento da resposta imunológica do hospedeiro infectado, da patogênese associada à infecção e a detecção da infecção pela elaboração de testes diagnósticos (BRASIL, 2013).

2.1.2 Ciclo de replicação do HTLV

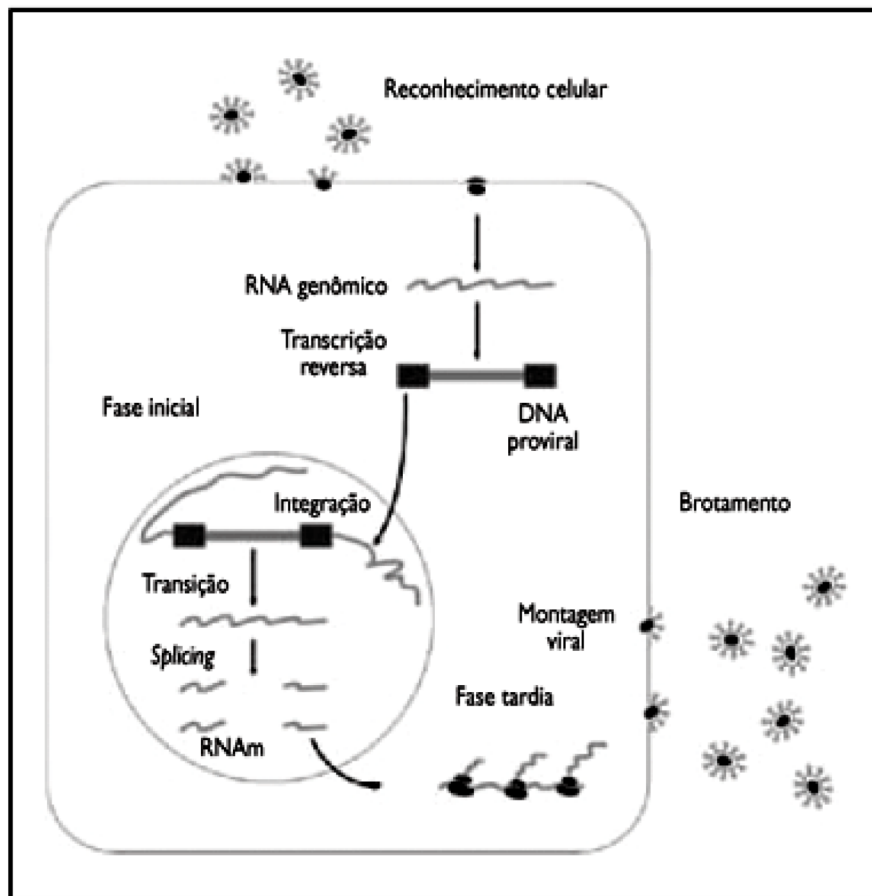
O mecanismo de replicação do HTLV tem início com a adsorção do vírus, por meio da ligação da glicoproteína de superfície (gp46) a um receptor específico na membrana plasmática da célula hospedeira (MANEL et al., 2005). O transportador de glicose (GLUT-1) foi identificado como sendo receptor para a gp46; entretanto, células que não expressam GLUT-1 também podem ser infectadas pelo HTLV (SCADDEN; FREEDMAN; ROBERTSON, 2016).

Após a adsorção, o HTLV penetra a célula hospedeira com o auxílio da glicoproteína transmembrana (gp21), por processo de fusão, onde o envelope viral se funde à membrana celular do hospedeiro para a entrada do capsídeo viral. Ao entrar na célula ocorre o desnudamento do capsídeo, liberação do seu material genético, e as enzimas essenciais à replicação viral, a transcriptase reversa e a integrase iniciam o processo de replicação. Ainda no citoplasma, a transcriptase reversa, primeiro transcreve uma fita de RNA-DNA e depois DNA-DNA, dando origem à fita dupla de DNA complementar. A integrase o leva para o núcleo celular e o integra ao genoma

da célula infectada, formando assim, o provírus ou DNA proviral (LAIRMORE; FRANCHINI, 2007).

A integração do provírus determina o final da fase precoce da replicação viral e inicia o ciclo tardio mediado por enzimas do hospedeiro. Então a síntese de RNA viral ocorre tendo como DNA molde o provírus integrado (KROON; PROIETTI, 2015). A célula produz RNA mensageiro levando a produção de proteínas essenciais para a replicação viral (LAIRMORE; FRANCHINI, 2007). As partículas virais podem continuar no fluido celular ou sair da célula por brotamento, a partir da membrana celular, e infectar novas células alvos suscetíveis (KROON; PROIETTI, 2015; MARTIN et al., 2016) (Figura 1). Contudo, a entrada do HTLV nos linfócitos T ocorre mais eficazmente por contato direto célula a célula do que pelo vírus livre no plasma (PIQUET; JONES, 2012; SCADDEN; FREEDMAN; ROBERTSON, 2016). Esta transmissão célula a célula pode ocorrer tanto por interações entre células dendríticas e linfócitos T quanto entre linfócitos T (PIQUET; JONES, 2012). A replicação viral também pode ocorrer por divisão mitótica de células infectadas com o provírus integrado. A replicação inicia o processo de imunidade do hospedeiro e o ponto de partida para o controle da proliferação celular. No entanto, o HTLV desenvolve estratégias para driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro para permitir a persistência do vírus (MARTIN et al., 2016).

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de replicação do HTLV.



Fonte: Kroon; Proietti. In: Carneiro-Proietti, A.B.F. (Org). Cadernos Hemominas (2015).

2.1.3 Vias de transmissão do HTLV

As principais vias de transmissão destes vírus são pela relação sexual desprotegida, por transfusão sanguínea ou hemoderivados celulares, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas por usuários de drogas injetáveis, e pela transmissão vertical por via transplacentária, durante o parto ou por meio do aleitamento materno (MANNS; GRENADE, 1999; GESSAIN; CASSAR, 2012). A transmissão também pode ocorrer pela doação de órgãos e tecidos infectados (MATEOS et al., 2005; ROMANELLI et al., 2010). Em áreas endêmicas, as principais rotas de transmissão do HTLV-1/2 são por relação sexual e transmissão vertical, enquanto em áreas não endêmicas a transfusão de células infectadas parece exercer importante papel na disseminação da infecção (CATALAN-SOARES et al., 2005; BEILKE, 2012).

A transmissão por relação sexual ocorre com maior efetividade do homem infectado para a mulher, principalmente em parcerias de longa permanência (BRASIL, 2004; GESSAIN; CASSAR, 2012), e é considerada a responsável pelo aumento da prevalência em mulheres com a idade (GESSAIN; CASSAR, 2012). Tem sido demonstrado que indivíduos que se infectam pela via sexual apresentam uma carga proviral menor que aqueles que se infectam pelas vias vertical e parenteral (ROUCOUX et al., 2005; PAIVA; CASSEB, 2014), sendo necessárias repetidas exposições para que ocorra à infecção, o que pode justificar o aumento da prevalência do HTLV com o avançar da idade (DE OLIVEIRA et al., 2012; GESSAIN; CASSAR, 2012). Este tipo de infecção é consequência da passagem de linfócitos T infectados presentes no sêmen e na secreção vaginal (GESSAIN; CASSAR, 2012; PERCHER et al., 2016).

A transmissão perinatal ou intrauterina ocorre, mas é menos frequente que a transmissão pelo aleitamento materno, que pode ocorrer em aproximadamente 20% das crianças amamentadas por mães infectadas (HINO, 2011). Essa transmissão ocorre devido à presença de linfócitos T infectados pelo HTLV no leite materno, resultando na infecção da criança (GESSAIN; CASSAR, 2012; PERCHER et al., 2016).

A transmissão vertical depende principalmente do tempo de aleitamento materno. Sendo que períodos prolongados de amamentação (por mais de 6 meses), alta carga proviral no leite materno e nas células sanguíneas, e elevado título de anticorpos no soro aumentam a probabilidade de infecção da mãe para o filho (LI et al., 2004; HINO, 2011; PAIVA et al., 2018)). A incorporação da triagem sorológica para o HTLV-1/2 no pré-natal das gestantes torna-se primordial no controle e prevenção da disseminação da infecção por esta via (ROMANELLI et al., 2010).

Além do tempo de exposição aos fatores de risco (amamentação ou relação sexual), a carga proviral também tem um importante papel na transmissão horizontal e vertical do vírus (MARTINS et al., 2015). A infecção por via transfusional ocorre em 20 a 63% dos receptores, e se dá pelo recebimento de componentes celulares sanguíneos contaminados (GOTUZZO et al., 2007; GESSAIN; CASSAR, 2012). A baixa carga proviral e o fato da infecção ser dependente do contato célula a célula

fazem com que a transmissão pelo HTLV seja menos eficiente que a causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SANTOS; LIMA, 2005).

Em um estudo realizado em Minas Gerais que avaliou a transmissão do HTLV-1/2 em grupos familiares, onde mulheres ex-doadoras de sangue, com sorologia positiva para HTLV-1/2, e seus familiares foram avaliados, os autores chegaram à conclusão que a via sexual foi a principal via de disseminação da infecção pelo HTLV, semelhante ao que ocorre em outros países com alta prevalência de HTLV (HORIGUCHI et al., 2014).

2.2 Aspectos epidemiológicos do HTLV

2.2.1 Distribuição geográfica do HTLV-1/2

Os HTLV-1 e 2 apresentam ampla distribuição mundial. O HTLV-1 é endêmico em várias áreas geográficas, incluindo a África sub-Saariana ou equatorial, Américas do Sul (incluindo o Brasil) e Central, Ilhas Caribenhas, Japão, Oriente Médio e Ilhas da Melanésia. Nas regiões endêmicas a prevalência aumenta com a idade e é maior no sexo feminino (KROON; PROIETTI, 2015; SZCZYPINSKA et al., 2015). O HTLV-1 tem mantido taxas de soroprevalência de 3 a 6% em grupos populacionais específicos (Europa, Américas, Caribe e África) e altas prevalências em indivíduos das ilhas do sudoeste do Japão, onde a taxa de infectados pode variar de 6 a 37% (PROIETTI et al., 2005). A América do Sul também é considerada um importante foco de infecção pelo HTLV-1 e doenças associadas (GESSAIN; CASSAR, 2012).

O HTLV-2 apresenta altas taxas de infecção nas Américas (Norte, Central, e Sul) e Europa, sendo endêmico em populações indígenas. Em algumas tribos a soroprevalência é estimada em torno de 13% e em usuários de drogas injetáveis 20%. Nos Estados Unidos ele tem sido frequentemente detectado em usuários de drogas injetáveis (GONÇALVES et al., 2010; SZCZYPINSKA et al., 2015).

2.2.1.1 Subtipos do HTLV-1/2 e suas distribuições geográficas

Subtipos do HTLV-1/2 têm sido descritos e determinados por meio do sequenciamento de genes localizados nas extremidades LTR, classificando o HTLV-1 em sete subtipos (a-g) e o HTLV-2 em quatro subtipos (a-d), diferentemente distribuídos geograficamente. Com relação ao HTLV-1, o subtipo 1a é considerado cosmopolita e está presente em países da Europa, sul da América do Norte e na América do Sul, inclusive no Brasil. O subtipo 1a possui variantes que têm sido encontradas formando quatro subgrupos (A-D): variante A que tem distribuição transcontinental; B: japonês (endêmico no Japão e em áreas isoladas da América do Sul); C: oeste da África, e D encontrado no norte da África. O subtipo 1b ou da África Central é endêmico na África Central, mas, os subtipos 1d, 1e, 1f, e 1g são também encontrados na África (MOENS et al., 2009; GESSAIN; CASSAR, 2012). O subtipo 1c tem sido encontrado em aborígenes australianos e em habitantes de Papua em Nova Guiné (GESSAIN et al., 1991); o subtipo 1d foi encontrado também em pigmeus na República de Camarões (CASSAR et al., 2005). O subtipo 1b africano, que era restrito a países da África Central, foi recentemente encontrado no Brasil, no Estado do Rio de Janeiro, o que demonstra que a disseminação viral está progredindo em nível global (ZANELLA et al., 2012). Os variados subtipos de HTLV-1 não estão associados a diferentes manifestações clínicas, contudo a subtipagem molecular pode ser um importante instrumento para fins epidemiológicos (SANTOS; LIMA, 2005).

Dentre os subtipos de HTLV-2, o subtipo 2a é encontrado principalmente no hemisfério ocidental e Europa (SZCZYPINSKA et al., 2015); o subtipo 2b é mais encontrado em populações ameríndias; o subtipo 2c é encontrado principalmente em índios caiapós brasileiros e em usuários de drogas injetáveis em São Paulo (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002b), e o 2d, é mais frequente em populações africanas (MOENS et al., 2009).

2.2.2 Epidemiologia do HTLV-1/2 no Brasil

O HTLV entrou no Brasil provavelmente pela imigração de populações infectadas da Ásia que atravessaram o Estreito de Bering, pelo tráfico de escravos africanos no período colonial e pelo fluxo migratório de japoneses no século XX. No

Brasil, a infecção pelo HTLV-1 é endêmica entre indivíduos com descendência africana, enquanto que a infecção pelo HTLV-2 é endêmica entre os usuários de drogas injetáveis e populações nativas da Amazônia (PAIVA; CASSEB, 2015).

Apesar do HTLV ter sido detectado no Brasil desde a década de 80, somente em novembro de 1993, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a pesquisa de anticorpos contra o HTLV-1/2 em bancos de sangue de todo o Brasil (Lei nº 1376), seguindo diretrizes já estabelecidas em Países como o Japão (1986) e os Estados Unidos (1988). Desde então, vários estudos têm sido realizados em amostras de doadores em bancos de sangue (PINTO et al., 2012). Como não existe a recomendação para a utilização de teste confirmatório e discriminatório em bancos de sangue, algumas vezes a prevalência é referida como sendo por HTLV-1/2 (CATALAN-SOARES et al., 2005; PINTO et al., 2012).

Em 1993, logo após a implantação da triagem sorológica do HTLV-1/2, foi realizado um estudo multicêntrico em cinco capitais brasileiras (Manaus, Recife, Salvador, Rio de Janeiro e Florianópolis), onde foi encontrada uma soroprevalência geral de HTLV-1 de 0,41% entre os doadores de sangue. Esta taxa de soroprevalência variou de 0,08 a 1,35%, de acordo com a região estudada, de 0,08% no Sul do país até 1,35% em Salvador-Bahia, onde foi observada a maior prevalência no País. Neste estudo, não foi encontrado a presença de HTLV-2 (GALVÃO-CASTRO et al., 1997).

A maioria dos estudos realizados no Brasil sobre a prevalência do HTLV avalia populações específicas (doadores de sangue, indígenas, usuários de drogas injetáveis, gestantes, etc.), sendo as principais fontes de conhecimento sobre esta infecção em nosso País (SODRE et al., 2010). No entanto, deveriam ser realizados mais estudos de base populacional para que a real prevalência do HTLV fosse conhecida (GESSAIN; CASSAR, 2012). O primeiro estudo com base populacional documentado no Brasil foi o de Dourado et al. (2003) em Salvador, onde a prevalência do HTLV-1 atingiu 1,74% da população geral, sendo que 1,2% eram homens e 2% eram mulheres, e dentre as mulheres 9,3% estavam acima dos 50 anos. Neste estudo, a infecção estava associada à idade, a baixa escolaridade, menor renda e piores condições de vida (DOURADO et al., 2003). Recentemente foi realizado outro estudo com base populacional em Salvador, onde a prevalência de HTLV-1 na população geral foi de 1,48%, que aumentou com a idade, e 56,4% das pessoas avaliadas era

do sexo feminino. Neste estudo, os autores sugeriram que a transmissão por contato sexual foi a principal via de infecção pelo HTLV-1 entre adultos em Salvador (NUNES et al., 2017).

Estudo realizado em todos os hemocentros da rede de bancos de sangue públicos, no período de 1996-2000, demonstrou uma heterogênea soroprevalência de HTLV-1/2 entre infectados das 26 capitais brasileiras e do Distrito Federal. Dentre elas, as capitais de Santa Catarina 0,04%, Minas Gerais 0,66%, São Paulo 0,32%, Pernambuco 0,75%, Pará 0,91%, Bahia 0,94% e Maranhão 1%, sendo a prevalência menor na região Sul e maior nas regiões Norte e Nordeste (Pará, Pernambuco, Bahia e Maranhão) (CATALAN-SOARES et al., 2005). Segundo Dias-Bastos et al. (2010) está ocorrendo um declínio na prevalência de HTLV-1/2 em doadores de sangue na maioria das capitais brasileiras analisadas. Dentre as capitais investigadas, São Luís, capital do Estado do Maranhão foi a que apresentou a mais alta prevalência (1%). No entanto, estudo mais recente de prevalência de HTLV-1/2 em São Luís apontou outro panorama de prevalência (0,15%), ocorrendo um declínio na prevalência, assim como ocorreu nas outras capitais (VIANA et al., 2014).

Em estudo conduzido por Carneiro-Proietti et al. (2012) em doadores de sangue de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco, a prevalência do HTLV-1/2 encontrada em Pernambuco foi mais que o dobro do que a encontrada em São Paulo (2,2/1000 versus 1,01/1000). Esta variação regional de prevalência do HTLV-1/2 no Brasil pode ser explicada pelas diferentes características étnicas de sua população. A região Nordeste possui um percentual maior de descendentes africanos e ameríndios do que a região Sul (BARMPAS et al., 2014).

Alguns estudos foram realizados em gestantes e puérperas, demonstrando prevalências variadas de acordo com o local analisado. Em Mato Grosso do Sul a soroprevalência encontrada foi de 0,13% (DAL FABBRO et al., 2008), Mato Grosso 0,20% (YDY et al., 2009); Espírito Santo 0,60% (LIMA; VIANA, 2009), Minas Gerais 0,07% (RIBEIRO et al., 2010), Pará 0,30% (SEQUEIRA et al., 2012), Bahia 1,05% (MELLO et al., 2014) e Rio de Janeiro 0,66% (MONTEIRO et al., 2014). Em 2009, foi realizado um estudo sobre a prevalência do HTLV-1/2 em 2.044 gestantes da capital maranhense, e a taxa de soroprevalência encontrada foi considerada relativamente elevada (0,30%). Os autores ressaltaram que o rastreamento desse vírus durante o

pré-natal se justifica, já que a possibilidade de transmissão vertical é elevada (SERRA-SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

Em estudo conduzido em São Paulo com portadores de hepatites B e C, a prevalência encontrada entre os portadores de hepatite C foi de 3,2% para HTLV-1 e 2,1% para HTLV-2; e entre os portadores de hepatite B foi de 0,8% para HTLV-1 e 0,5% para HTLV-2, sendo a maioria dos indivíduos coinfectados com hepatite C/ HTLV e hepatite B/ HTLV do sexo masculino. De acordo com estes achados, os autores sugeriram a incorporação da triagem sorológica para o HTLV-1/2 na rotina de exames usados no acompanhamento dos pacientes portadores de hepatites virais, principalmente em áreas endêmicas para HTLV-1/2 no Brasil (CATERINO-DE-ARAUJO et al, 2018). Em outra pesquisa realizada em São Paulo com portadores HIV/AIDS a prevalência da coinfeção HIV/ HTLV foi de 3,11%, sendo 1,55% pelo HTLV-1, 1,31% pelo HTLV-2 e 0,25% por HTLV não tipado. Os autores consideraram esta prevalência baixa comparada as altas prevalências detectadas na década de 90 em São Paulo, que também estavam associadas ao uso de drogas injetáveis (CATERINO-DE-ARAUJO et al., 2015).

2.2.3 Infecção pelo HTLV- 1/2 e doenças associadas

A história natural das doenças relacionadas ao HTLV-1 ainda não está bem estabelecida, entretanto, uveítes, dermatites infecciosas, além de outros processos inflamatórios imunomediados como síndrome de Sjogren, artrite e polimiosite, podem estar igualmente relacionados à infecção por este vírus (CARNEIRO-PROIETTI, 2002a; VERDONCK et al., 2007). O desenvolvimento de doenças específicas relacionadas ao HTLV-1 podem ser favorecidas de acordo com a via de transmissão. Desta maneira, a LLTA correlaciona-se epidemiologicamente mais com a transmissão via aleitamento materno (LOUREIRO; LOPES, 2015; PERCHER et al., 2016), enquanto que a PET/MAH com a transmissão via transfusão sanguínea. A LLTA também pode ocorrer após transfusão sanguínea, mas é exceção (BRASIL, 2013). O desenvolvimento da PET/MAH, com rápida progressão, também está associado à transmissão por doação de órgãos, provavelmente devido à imunossupressão a que os receptores estão submetidos (MATEOS et al., 2005; ROMANELLI et al., 2010).

A morbidade e a mortalidade que ocorrem devido à infecção causada pelo HTLV estão intimamente relacionadas às doenças etiologicamente causadas pelo HTLV-1 (LLTA ou PET/MAH) (SZCZYPINSKA et al., 2015). O tratamento destas doenças é limitado, e uma vez que ocorra a infecção, não tem como prevenir o aparecimento de doença (ROSADAS et al., 2019). LLTA é uma doença relacionada com imunossupressão, que aparece em 2 a 4% dos indivíduos infectados (FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2018). Os doentes de LLTA apresentam um baixo nível de resposta imunológica, enquanto que, os portadores de PET/MAH apresentam uma elevada resposta imune ao HTLV-1, sendo essa resposta verificada pelas altas concentrações de anticorpos no soro e no fluido cérebro-espinhal (SANTOS; LIMA, 2005).

A LLTA é uma doença hematopoiética de linfócitos T CD4+, maligna e agressiva que pode apresentar um período de latência de 30 a 50 anos, mas quando manifesta geralmente tem evolução rápida e fatal, e tempo médio de sobrevida estimado em dois anos (YASUNAGA; MATSUOKA, 2007; FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2018). O risco de desenvolver a doença é ligeiramente maior nos homens, e a LLTA possui quatro apresentações clínicas: aguda, crônica, linfoma e latente (*smoldering*) (RATNER, 2005; SCADDEN; FREEDMAN; ROBERTSON, 2017).

A PET/MAH pode apresentar uma evolução mais rápida, podendo aparecer em até três meses após a infecção. Entretanto, o seu período de latência é em torno de três anos, podendo atingir 20 a 30 anos (SZCZYPINSKA et al., 2015). A PET/MAH pode acometer de 1% a 5% dos portadores de HTLV-1 (ROMANELLI et al., 2010). Fatores de risco, tais como idade avançada, sexo feminino, alta carga proviral e uma ineficiente resposta imune celular estão também associados com o desenvolvimento da PET/MAH (BANGHAM; OSAME, 2005; LIMA; BICA; ARAUJO, 2005; PINTO et al., 2012).

A associação entre a infecção pelo HTLV-1 e outras patologias infecciosas também têm sido descritas. Uma maior prevalência de HTLV-1 é observada em pacientes hospitalizados com diagnóstico de tuberculose (11%), comparada a indivíduos sadios (1,8%) (MOREIRA et al., 1993). Além disso, indivíduos coinfectados têm uma maior mortalidade por tuberculose (PEDRA-SAMPAIO et al., 1997). Tem sido igualmente relatado que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam maior

prevalência de *estrongiloidíase* disseminada (PORTO et al., 2002) e de *Hanseníase* (GLASER et al., 1994).

A associação do HTLV-2 com problemas sistêmicos e neurológicos ainda não está bem definida, sendo menos frequente e de menor gravidade (POSADA-VERGARA et al., 2006). Contudo, apesar de apresentar menor patogenicidade, o HTLV-2 tem sido isolado ou detectado em pacientes com leucemia linfocítica crônica com neutropenia, leucemia prolinfocítica, linfoma cutâneo, síndrome de Sézary, dermatite esfoliativa, síndrome da fadiga crônica e distúrbios súbitos neurodegenerativos (MURPHY et al., 2004).

A via de transmissão do HTLV-1/2 é semelhante à de outros vírus como o HIV e os das hepatites B e C; e por compartilharem as mesmas rotas de transmissão não é incomum casos de coinfeção entre estes vírus (CAMPOS et al., 2015). Estas coinfeções podem ocorrer com relativa frequência em usuários de drogas injetáveis e em profissionais do sexo (BRASIL, 2013). Nos últimos anos a coinfeção do HTLV-1 e 2 vem surgindo como um problema de saúde mundial, com um número crescente de pessoas infectadas pelo HTLV-1/HIV-1 na América do Sul e na África, e infectadas pelo HTLV-2/HIV-1 na Europa e nos Estados Unidos (CASOLI; PILOTTI; BERTAZZONI, 2007; BEILKE, 2012).

A coinfeção HTLV/ HIV-1 pode interferir no desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), dependendo do tipo de HTLV envolvido na infecção (CASOLI; PILOTTI; BERTAZZONI, 2007). Na infecção HTLV-1/HIV-1, como ambos apresentam tropismo pelos linfócitos T CD4+, pode ocorrer progressão rápida para a SIDA. O HTLV-1 imortaliza a célula e aumenta o número de células T CD4+ e, desta maneira eleva a replicação viral de reservatórios latentes. Valores elevados de células T CD4+ também interferem com o início do tratamento antirretroviral, pois leva à falsa impressão de controle da replicação viral e da doença (MORIUCHI; MORIUCHI, 2000; BRITES et al., 2009). No entanto, quando a coinfeção é entre HTLV-2/ HIV-1 pode haver diminuição da replicação do HIV-1, com progressão lenta para a SIDA, tornando-se assim um fator protetor. Esta proteção está relacionada à resposta imune inata e a produção de quimiocinas que se ligam ao co-receptor para o HIV-1, impedindo sua penetração na célula hospedeira (OO et al., 2015). Este tipo

de coinfeção é frequente entre usuários de drogas intravenosas (BAGHERI et al., 2008).

2.2.4 Diagnóstico laboratorial e tratamento do HTLV- 1/2

O diagnóstico das infecções causadas pelo HTLV-1/2 é baseado na detecção sorológica de anticorpos específicos circulantes, no sangue do indivíduo infectado, contra determinantes antigênicos presentes na partícula viral (core e envelope) (KROON; PROIETTI, 2015). Estes anticorpos podem ser medidos por diferentes sistemas de detecção, tais como pelo Imunoensaio Quimioluminescente com micropartículas (CMIA), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ensaio de aglutinação passiva de partículas, *Western blot* (WB), Imunofluorescência Indireta e ensaio de radioimunoprecipitação (SABINO; CARVALHO, 2015).

O diagnóstico sorológico do HTLV é geralmente realizado em duas etapas: um teste sorológico de triagem (sensível) e um teste confirmatório mais específico. Se o teste de triagem inicial for reagente, ele deve ser repetido em outra amostra e se as amostras forem repetidamente reagentes deve ser realizado o teste confirmatório (BRASIL, 2004; DOUGAN et al., 2005; SABINO; CARVALHO, 2015). No entanto, a legislação brasileira não obriga a realização dos testes confirmatórios para o HTLV (CATALAN-SOARES et al., 2005; PINTO et al., 2012).

Apesar dos testes sorológicos de triagem detectarem a infecção, eles não permitem identificar o sorotipo de HTLV envolvido (em virtude da significativa homologia nas proteínas estruturais entre os dois vírus) e comumente apresentam reações falso-positivas (DOUGAN et al., 2005; GESSAIN; CASSAR, 2012; SABINO; CARVALHO, 2015). Além disso, estes testes são limitados, podendo falhar em população de baixo risco como doadores de sangue, devido ao baixo valor preditivo positivo (SABINO; CARVALHO, 2015), e em indivíduos com infecção recente, uma vez que a resposta imunológica poderá ainda não ter se manifestado (janela imunológica da infecção) (CARRAZONE; BRITO; GOMES, 2004; SABINO; CARVALHO, 2015).

Em bancos de sangue somente 10% a 50% dos testes de triagem reativos são confirmados posteriormente. Tornando-se assim, necessário o uso de exames

confirmatórios de alta especificidade, que são capazes de diferenciar a infecção como sendo causada pelo HTLV-1 ou HTLV-2, ou ainda descartar os casos falso-positivos (SALLES et al., 2003; SABINO; CARVALHO, 2015). Deve-se ressaltar que não existe um teste padrão ouro para detectar a infecção pelo HTLV, e que todos os testes confirmatórios possuem limitações, o que pode dificultar a orientação do indivíduo reativo (SABINO; CARVALHO, 2015). O teste de triagem mais utilizado para a detecção do HTLV-1/2 é o ELISA e o confirmatório é o WB (SABINO; CARVALHO, 2015; KURAMITSU et al., 2017). O WB detecta a reação sorológica contra as proteínas Gag p19, p24 e p53 e do envelope Env gp46. Mas, pode ocorrer uma ligação parcial dos anticorpos contra as proteínas Gag ou Env, mostrando um resultado indeterminado (KURAMITSU et al., 2017).

O ELISA tem sido amplamente utilizado na rotina laboratorial, entretanto, ele detecta anticorpos tanto para HTLV-1 quanto para HTLV-2, não os diferenciando (DOUGAN et al., 2005). Os kits de ELISA mais recentes têm sido preparados com proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos, melhorando assim, a sua especificidade. Também foram incluídas proteínas específicas para o HTLV-2 na tentativa de aumentar a sensibilidade para este agente (SABINO; CARVALHO, 2015). Porém, dependendo do tipo de ELISA utilizado na triagem sorológica, a porcentagem de resultados indeterminados pode ser muito alta (SABINO; CARVALHO, 2015).

Apesar do WB ser o teste mais utilizado para a confirmação de soropositividade nos testes de triagem, ele pode apresentar uma alta proporção de resultados indeterminados (ISHAK et al., 2007; MOENS et al., 2009; KURAMITSU et al., 2017). Além disso, nos casos de infecção pelo HTLV-3 e HTLV-4, um WB indeterminado parece ser a regra e não a exceção (MOENS et al., 2009). Não há um consenso internacional sobre a interpretação do WB. Entretanto, a Organização Mundial de Saúde adotou como critério de positividade para os testes de WB, a seguinte situação: quando a amostra apresentar reatividade para uma proteína da região env (gp46 e gp21) e uma proteína da região gag (p19 e p24) (SABINO; CARVALHO, 2015).

Os kits de WB atuais possuem proteínas recombinantes (rgp46-I e rgp46-II), que permitem a diferenciação entre os HTLV-1 e HTLV-2 (SABINO; CARVALHO, 2015). Porém, resultados indeterminados podem ocorrer quando a amostra se apresenta reativa para uma das proteínas do vírus, mas não obedece a todos os

critérios de positividade. Nos casos de resultados indeterminados ou positivos não tipados deve-se realizar os testes de biologia molecular para a confirmação da infecção e do tipo de vírus envolvido (KURAMITSU et al., 2017).

Indivíduos infectados pelo HTLV (PCR positiva) podem apresentar resultados indeterminados no WB quando a resposta sorológica não está completa. Isto pode ocorrer particularmente em indivíduos imunossuprimidos, em infectados pelo HTLV-2 e naqueles que estão em fase de soroconversão. Outra possibilidade para resultados indeterminados pode ser pela presença de estirpes virais divergentes (SABINO; CARVALHO, 2015). Mesmo resultados indeterminados com PCR negativa devem ter acompanhamento, pois podem indicar exposição ao HTLV (ROMANELLI et al., 2010). Ressalta-se, ainda, que seja possível ter casos falso-positivos no WB, particularmente em soros com reatividade para as proteínas virais p19 (*gag*) e rgp21 (*env*), levando a dificuldades de interpretação e aconselhamento, além disso, o alto custo dos testes de WB dificulta a sua ampla utilização na rotina laboratorial (SABINO; CARVALHO, 2015).

Outros métodos diagnósticos podem ser utilizados na confirmação da infecção pelo HTLV-1/2, tais como a imunofluorescência indireta e a PCR (ARAÚJO et al., 2009; GESSAIN; CASSAR, 2012; SABINO; CARVALHO, 2015). Outro teste promissor é o imunoblot (INNO-LIA HTLV) que utiliza somente antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos, com a vantagem de só possuir proteínas específicas. O poder de discriminação deste teste parece ser melhor, com um menor número de resultados indeterminados, porém assim como o WB apresenta um custo bastante elevado (SABINO; CARVALHO, 2015).

Devido à ausência de viremia plasmática do HTLV, ou seja, ausência de RNA viral circulante em grandes quantidades no soro ou plasma, o método molecular de diagnóstico mais apropriado é aquele que detecta o DNA proviral em células mononucleadas periféricas por meio da PCR (SABINO; CARVALHO, 2015). A utilização da PCR convencional, com iniciadores específicos para determinados alvos, como por exemplo, para os genes *pol* e *tax*, que codificam proteínas da região mais conservada do genoma viral, tem se tornado o método de referência para determinar o “status” de infecção, e distinguir o HTLV-1 do HTLV-2. Ela está indicada para

pacientes com sorologia inconclusiva ou com WB indeterminado ou não tipado (MOENS et al., 2009; SABINO; CARVALHO, 2015).

A PCR pode ser extremamente útil no diagnóstico precoce das infecções por HTLV em crianças com até dois anos de idade, infectadas por transmissão vertical, uma vez que os testes sorológicos não acusam a infecção, não podendo ser descartada a transferência passiva de anticorpos maternos por via transplacentária; e os testes sorológicos também não detectam a infecção durante o período de janela imunológica, compreendido entre a exposição e a soroconversão (SANTOS; LIMA, 2005; SABINO; CARVALHO, 2015). Sendo assim, a PCR pode apresentar resultados mais conclusivos, além de possuir um custo menor que o ensaio de WB. Entretanto, ainda não existe um teste comercial padronizado para realização da PCR e a qualidade dos testes “*in house*” podem variar consideravelmente (BRASIL, 2013; KROON; PROIETTI, 2015).

Um ensaio de nested PCR seguido da digestão enzimática dos produtos amplificados e sequenciamento foi utilizado para a caracterização molecular do HTLV-1/2 em amostras de doadores de sangue em Belém do Pará. As amostras de HTLV-1 sequenciadas foram classificadas como pertencentes ao subtipo cosmopolita (subgrupo transcontinental – HTLV-1aA), e as de HTLV-2 foram identificadas como sendo HTLV-2c e HTLV-2b (primeiro relato na Amazônia brasileira) (SANTOS et al., 2009).

A PCR em tempo real ou PCR quantitativa também pode ser utilizada no acompanhamento de pessoas infectadas pelo HTLV, uma vez que ela quantifica a carga proviral, tornando assim, o acompanhamento mais eficiente. Porém essa técnica tem um custo mais elevado que a PCR convencional (SANTOS; LIMA, 2005). O conhecimento da carga proviral também pode ajudar no monitoramento da eficácia quimioterápica e/ou anti-retroviral dos pacientes com LLTA (TAMEGÃO-LOPES et al., 2006).

As infecções causadas pelo HTLV-1/2 ainda não têm cura nem vacina. Como o risco de aparecimento de doenças associadas é considerado baixo, também não existe um tratamento específico e eficaz para a infecção (SCADDEN; FREEDMAN; ROBERTSON, 2017). Diferentemente da infecção causada pelo HIV que já possui um arsenal terapêutico para controle da infecção, as infecções pelo HTLV são

consideradas negligenciadas (SANGIOVANNI, 2017; PUCCIONI-SOHLER et al., 2019). O tratamento é direcionado apenas contra as doenças relacionadas ao vírus. Sendo assim, os portadores assintomáticos não são tratados, apenas devem ser aconselhados e acompanhados em serviços de saúde especializados para diagnosticar e tratar precocemente as doenças associadas ao vírus (BRASIL, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar por métodos sorológicos e moleculares a prevalência de infecção pelo HTLV-1/2 em gestantes do Estado do Maranhão, compreendidas nas faixas etárias de 15 a 45 anos de idade, atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Maranhão (LACEN-MA).

3.2 Específicos

- ✓ Traçar o perfil sociodemográfico e epidemiológico das gestantes investigadas;
- ✓ Detectar por CMIA e pela PCR a ocorrência de infecção por HTLV-1/2 em amostras de sangue periférico das gestantes atendidas no LACEN-MA;
- ✓ Diferenciar por WB e pela PCR os tipos de HTLV que estão circulando em gestantes do Estado do Maranhão;
- ✓ Detectar casos de coinfeção pelo HTLV-1/2 pelo ensaio de PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade CEUMA sob o Parecer Consubstanciado nº 372.289/2013 (ANEXO A), em atendimento as exigências da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde que norteia a pesquisa envolvendo seres humanos, direta ou indiretamente.

Todas as participantes receberam informações sobre os objetivos da pesquisa, bem como dos prováveis benefícios que ela poderia trazer. Aquelas que manifestaram interesse em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – APÊNDICE A) e foram entrevistadas para coleta de dados por meio do preenchimento de questionário padronizado (APÊNDICE B). Das voluntárias menores de idade foram obtidos os consentimentos de seus pais ou responsáveis. Sendo respeitado o anonimato e a confidencialidade dos dados.

4.2 Tipo, período e amostra do estudo

Trata-se de um estudo transversal realizado em 713 gestantes, com faixa etária de 15 a 45 anos, atendidas no LACEN-MA no período de fevereiro de 2015 a maio de 2017, que aceitaram participar da pesquisa mediante a assinatura do TCLE, e que não apresentavam desordens psiquiátricas que impedissem as suas participações na pesquisa.

4.3 Coleta de dados e amostras

A triagem das gestantes foi realizada por livre demanda no Setor de Imunologia do LACEN-MA quando foram realizar os exames da rotina pré-natal, onde receberam todas as informações sobre a pesquisa e assinaram o TCLE. Inicialmente, realizou-se a coleta de dados sociodemográficos e epidemiológicos das participantes por meio do preenchimento de um questionário composto de perguntas fechadas (Apêndice A). Os questionários foram aplicados por pessoas treinadas para esta finalidade.

Para a execução do projeto foram coletadas amostras de sangue periférico (sangue total e soro) das gestantes, que eram procedentes de diferentes municípios do Estado do Maranhão. Para a coleta das amostras sanguíneas foram puncionados por via intravenosa 10 mL de sangue de cada gestante, sendo 5 mL em tubo tipo Vacutainer® contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) como anticoagulante para obtenção do sangue total e 5 mL em Vacutainer® sem anticoagulante para obtenção do soro. Todas as coletas sanguíneas foram realizadas por técnicos treinados do LACEN-MA.

4.4 Processamento e análise das amostras

4.4.1 Triagem sorológica

Todas as amostras de soro foram triadas em ensaios sorológicos para HTLV-1/2 por Imunoensaio Quimioluminescente com micropartículas (ARCHITECT rHTLV-I/II – Abbott Diagnostics, Alemanha) para a determinação qualitativa de anticorpos anti-HTLV-1/2. Os resultados considerados reagentes por este método foram confirmados pelo teste de *Western blot* (HTLV BLOT 2.4 – MP Diagnostics, Singapura). Todos os testes foram feitos e interpretados segundo as orientações dos fabricantes, e realizados no Setor de Imunologia do LACEN-MA.

4.4.2 Extração de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

As extrações de PBMC foram efetuadas como segue: inicialmente as amostras de sangue total foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS - 0,01 M, pH 7,2), em iguais proporções (1:1), à temperatura ambiente. Em seguida, em tubos de polipropilenos de 15 mL tipo Falcon foram colocados iguais volumes de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Estados Unidos) e das amostras diluídas. Primeiro colocou-se o Ficoll-Paque Plus e depois a amostra foi depositada lentamente sobre o Ficoll-Paque Plus, sem deixar misturar o Ficoll e a amostra. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 400 x g à temperatura de 18-20°C. A seguir, os anéis leucocitários formados foram coletados e transferidos para outros tubos de 15 mL, e lavados por duas vezes com 6 mL de PBS, sendo

centrifugados por 10 minutos a 100 x g. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos formados foram ressuspensos em 0,5 mL de meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute* 1640 medium). As PBMC foram armazenadas a -80°C até a extração do DNA.

4.4.2.1 Extração de DNA proviral das amostras de PBMC e reações de PCR

Para o processo de extração do DNA foi utilizado um kit comercial *QIAamp DNA Blood kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As alíquotas de DNA obtidas foram quantificadas em nanodrop 2000/2000c *Spectrophotometer* (Wilmington, Estados Unidos) e armazenadas a -20°C até o momento do uso. Posteriormente, o DNA foi submetido a amplificação por PCR com uso de dois jogos de iniciadores desenhados para este estudo a partir do gene *tax* do HTLV-1 e 2.

As reações de PCR foram feitas num volume final de 25 µL, contendo 1 µL de cada iniciador específico (10 pmol/L), sendo o iniciador senso universal que amplifica os dois tipos de HTLV (HTLV-1/2: FW1 sense 5'-CTCCTTCCCCACCCARCGAACATTC-3') e os dois iniciadores antissenso específicos para o HTLV-1 (RV1- 5'-TAGGGAACATTGGTGAGGAAG-3') e para o HTLV-2 (RV2- 5'-CAGGTGGTGTAGATGTTTTGG-3'), que amplificam fragmentos de 336 e 213 pb, respectivamente. Adicionalmente, foram acrescentados em cada tubo de reação 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega®, Estados Unidos) [Taq DNA polimerase (dNTPs, MgCl₂, tampão de PCR [pH 8,5])], 1,5 µL de água livre de nuclease e 300 nanogramas do DNA molde.

Para as reações de amplificação, utilizou-se um termociclador *Mycycler Bio Rad system* modelo 580BR3578 (California, Estados Unidos) sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Nas reações de amplificação foram usados controles positivos para HTLV-1 (DNA células MT2 infectadas) e controles negativos (água livre de nuclease).

Os produtos amplificados da PCR foram aplicados em gel de agarose 2% e submetidos a eletroforese em tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA) [45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA] em pH 8.0 a 85 V durante 1 hora, e em seguida corados com Brometo de Etídio (0.5 µg/mL) por 15 minutos (SAMBROOK; FRITCH; MANIATS, 1989). Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados utilizou-se na eletroforese o marcador de tamanho molecular de 100 pb DNA *ladder* (Promega®, Estados Unidos). Os produtos foram visualizados em transiluminador ultravioleta 320 nm (KASVI, Brasil) e fotodocumentados.

4.5 Sequenciamento do fragmento amplificado para o HTLV-1

Com o objetivo de confirmar a identificação dos perfis obtidos na PCR para o HTLV-1 os produtos amplificados foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System* (Promega®, Estados Unidos) segundo as orientações do fabricante. O sequenciamento de cada produto purificado foi feito pelo método da terminação da cadeia por dideoxynucleotídeos (SANGER; NICKELLEN; COULSON, 1977), em ambas as direções da dupla fita (senso e antissenso) com o “Kit ABI *Prism BigDye*” no sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas pelo menos duas vezes em cada sentido da fita perfazendo um total de quatro sequências da mesma amostra. Todos os sequenciamentos foram feitos pela empresa Myleus Biotecnologia Ltda, sediada em Belo Horizonte - MG.

4.5.1 Análise computacional das sequências

Para verificar a qualidade das sequências, os eletroferogramas obtidos durante o processo de sequenciamento foram analisados no programa de dados ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). A similaridade entre as sequências foi verificada com o auxílio do programa BLASTn do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (ALTSCHUL et al., 1997), de onde foram selecionadas sequências do HTLV-1 existentes no *Genbank* para análises comparativas pelo programa MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013).

4.6 Análises estatísticas

Os dados foram avaliados pelo programa IBM SPSS *Statistics* 20.0 (2011). As variáveis quantitativas foram descritas por meio de médias e desvio padrão, e as variáveis qualitativas por frequências absolutas e relativas. A análise da associação das variáveis em relação aos grupos PCR-HTLV (positivo e negativo) foi feita pelo teste Exato de Fisher. A variável numérica idade foi avaliada em relação aos dois grupos através do teste t-Student para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo Científico

**Molecular detection of human T-lymphotropic vírus type 1
in pregnant women from Maranhão state, Brazil**

(Aceito pelo Brazilian Journal of Microbiology. Qualis B1 para
Biotecnologia. Fator de Impacto 2,34)

Molecular detection of human T-lymphotropic virus type 1 in pregnant women from Maranhão state, Brazil

ABSTRACT

The human T-cell lymphotropic virus (HTLV) has a worldwide distribution. HTLV is endemic in some states in the northeastern region of Brazil. This study investigated the prevalence of HTLV-1/2 in 713 pregnant women attended at the Central Laboratory of Public Health of Maranhão (LACEN-MA) between February 2015 and May 2017. Serological screening was performed by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), and reactive sera were subsequently confirmed by Western blot (WB) analysis. Five samples were determined to be HTLV-1/2-reactive by CMIA analysis, while in the WB analysis, 3 sera were positive for HTLV-1, and two were indeterminate. The polymerase chain reaction (PCR) analysis used to detect HTLV-1 proviral DNA showed a specific 336-base-pair fragment for HTLV-1 in all CMIA-reactive serum samples. PCR products were purified and sequenced. We observed a 0.7% molecular prevalence of HTLV-1 infection. The average age of the HTLV-1-positive pregnant women was 25.6 ± 8.2 years, and the average age of the HTLV-1-negative pregnant women was 24.4 ± 6.2 ($p = 0.60$). We observed that there was no association of HTLV-1 infection with age, ethnicity, marital status, educational level, family income, age of first sexual intercourse, previous pregnancy, breastfeeding, intravenous drug use by partner, history of blood transfusions or use of condoms. The prevalence of HTLV-1 observed in pregnant women demonstrated the need to implement public health policies for the screening of HTLV-1/2 in prenatal care and counseling to avoid breastfeeding by infected women; this approach could control vertical transmission and reduce the spread of this virus in the population.

Keywords: HTLV-1/2; Pregnant woman; Prevalence; Seroprevalence; PCR

Introduction

The human T-cell lymphotropic virus (HTLV) belongs to the genus *Deltaretrovirus* type C, family *Retroviridae* and subfamily *Orthoretrovirinae* [1], including four known serotypes, ranging from HTLV-1 to HTLV-4 [2]. Types 1 and 2 are more prevalent and are responsible for human infections. Types 3 and 4 have not been associated with disease in humans, although they have been detected and isolated from Central African populations [3, 4].

Transmission of HTLV-1/2 can occur through infected T lymphocytes via blood transfusion and/or hemoderivatives, transplantation of organs and tissues, sharing of needles and syringes, sexual intercourse, and vertical transmission (mother to child) [5].

Breastfeeding is the most common mode of vertical transmission of HTLV-1. It has been reported that some factors may be associated with the vertical transfer route, including prolonged breastfeeding, high proviral load in breast milk and blood cells, and elevated serum antibody titers [6,7].

HTLV-1 infections are lifelong, and most infected individuals remain asymptomatic. Approximately 10% of carriers can develop severe clinical complications, such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) or HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [2, 8]. Other clinical manifestations related to HTLV-1 infections are uveitis, arthropathies, infective dermatitis, and polymyositis [8], as well as symptoms resulting from coinfection with other infectious agents [9, 10].

Brazil is considered to be the country with the most significant number of individuals affected by HTLV-1 [11], having approximately 800,000 carriers [5], and this virus is present in the populations of all Brazilian regions with varying prevalence, with the highest prevalence being observed in the North and Northeast of Brazil [12].

The prevalence of HTLV-1/2 may vary according to geographical region, ethnicity, and individual risk behavior [13]. Most HTLV-1 endemic areas may be affected by age, socioeconomic, and genetic conditions, with a higher incidence being observed in women [5]. HTLV-1 is endemic among individuals of African origin, and HTLV-2 is endemic among intravenous drug users and native Amazonian populations [14].

Serological tests are the most commonly used method for the laboratory diagnosis of HTLV-1/2 infections, and they are related to the detection of specific components of the viral core and the viral envelope [15]. The two most commonly used techniques are the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), but these assays may present false-positive results and require further confirmation [16]. The confirmatory analysis commonly used is the Western blot (WB) analysis, which can differentiate HTLV-1 from HTLV-2. However, the WB analysis frequently yields indeterminate results and is costly [17].

Polymerase chain reaction (PCR) is an alternative approach for the diagnostic confirmation of HTLV-1/2 infections and has been used qualitatively and quantitatively [15, 16]. PCR is sensitive, specific, and less costly than WB analysis and may be used for the early diagnosis of HTLV infection, especially in cases where serological tests are unable to detect the virus [15].

To date, the Brazilian Ministry of Health has not established a standard protocol for the detection of HTLV-1/2 in pregnant women during prenatal counseling. Therefore, the absence of routine procedures for maternal screening may enable vertical transmission and increase the prevalence of infection with these viruses. The present study employed serological and molecular methods to investigate the prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women attended at the Central Laboratory of Public Health of Maranhão (LACEN-MA, Brazil).

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the Research Ethics Committee of the CEUMA University (CEP-UNICEUMA, n° 372.289/2013) and was conducted in keeping with the ethical precepts specified by the Resolution of the National Health Council of Brazil n° 466/2012. All women who agreed to participate in the study signed an informed consent form (ICF). The anonymity and confidentiality of the data were guaranteed.

Study population, blood sampling collection and serological screening

A cross-sectional study was conducted to determine the prevalence of HTLV-1 in pregnant women. The sample consisted of 713 pregnant volunteers who were selected by free choice during the prenatal period at the LACEN-MA between February 2015 and May 2017. The pregnant women were aged 15 to 45 years, and all agreed to participate in this study.

Two tubes of venous blood from each pregnant woman were collected by technicians of LACEN-MA according to the standard protocol for the collection of clinical samples. To isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), 5 mL of whole blood was collected in a Vacutainer® tube containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and to obtain blood serum, a tube with separator gel was used. Serum samples were screened for HTLV-1/2 by CMIA (Abbott Diagnostics, Germany), and the reactive samples were confirmed by WB analysis (HTLV BLOT 2.4, MP Diagnostics, Singapore). All tests were performed and interpreted according to the manufacturers' instructions.

Extraction of proviral DNA from PBMCs and PCR reaction conditions

The isolation of PBMCs was performed by Ficoll density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Life Sciences, USA) according to the manufacturer's instructions. Proviral DNA extraction from PBMCs was performed using the commercial QIAamp DNA Blood kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified using a NanoDrop 2000/2000c spectrophotometer (Wilmington, USA).

The PCR analyses were performed in a final volume of 25 μ L containing 10 pmol of each specific primer HTLV-1 sense, 5'- CTCCTTCCCCACCCARCGAACCYTC - 3', and HTLV-1 antisense, 5'-TAGGGAACATTGGTGAGGAAG-3', which amplifies a fragment with 336 base pairs (bp). This set of primers was designed specifically for this study from the HTLV-1 *tax* sequence. Also, 12.5 μ L of PCR Master Mix (Promega, USA) (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, PCR buffer [pH 8.5]), 1.5 μ L of nuclease-free water, and 300 ng of DNA template were added to each reaction tube. The MyCycler thermal cycler system (Bio-Rad, California, USA) was used for PCR assays under the following conditions: 1 cycle at 95 °C for 5 minutes (initial denaturation) followed by 35 cycles of 95 °C for 1 minute, annealing at 59 °C for 1 minute, extension at 72 °C for 1 minute, and a final extension at 72 °C for 5 minutes. Positive controls for HTLV-1 (DNA of infected MT2 cells) and negative controls (nuclease-free water) were also used.

The PCR products were loaded into a 2% agarose gel and subjected to electrophoresis at a voltage of 85 V for 1 hour in 1X Tris Borate EDTA (TBE) buffer containing (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA), pH 8.0. After electrophoretic running, the gels were stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL) for 15 minutes [18].

Sensitivity and specificity of the primers evaluated in this study

To analyze the limit of detection of primers designed for this study, our template was the DNA extracted from the PBMCs of the 708 serologically negative pregnant donors by CMIA for HTLV-1. Serial dilutions were performed from 300 ng of proviral DNA as follows: 1:2 (150); 1:4 (75); 1:8 (37.5) and 1:16 (18.75) ng. PCR assays performed in duplicate on alternate days verified the specificity of the primers.

Sequencing of the PCR products and computational analysis

To confirm the identity of the profile obtained by PCR for HTLV-1, the amplified products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kits (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing of each purified product was performed by the dideoxynucleotide chain termination method [19] in both directions on both strands (sense and antisense) using the ABI Prism BigDye Kit on the ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). All sequencing was performed at Myleus Biotecnologia Ltda. (Belo Horizonte - Minas Gerais, Brazil).

The similarity between the sequences was verified by the BLASTn program of the BLAST 2.0 package (Basic Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> [20] with HTLV-1 sequences from GenBank selected for comparative analyses by the MEGA program version 6.0 [21].

Statistical analysis

The data were evaluated by the software IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows [22]. Quantitative variables were described by means and standard deviation, and the qualitative variables were described by absolute and relative frequencies. Fisher's exact test was used to analyze the association of the classificatory variables concerning the PCR-determined HTLV-1 groups (positive and negative). The variable 'age' was evaluated in two HTLV-1 groups via Student's t-test. The level of significance for the analysis was set at 5%.

3. Results

Sociodemographic data of pregnant women evaluated

The analysis of the sociodemographic data of the 713 pregnant women showed that the average age was 24.3 ± 6.2 years (15-43), 63.8% were mulatto, 95.2% lived in the metropolitan area of São Luis (São Luis, São José de Ribamar, Paço do Lumiar and Raposa), 71.8% were either married or in a stable relationship, 61.0% had an education equal to or higher than a high school education, 53.7% were housewives, and 72.0% had a family income of 1 to 3 minimum wages. The other data, such as age, race, residence, marital status, and level of education, occupation, previous pregnancies, family income, and number of residents per household, are summarized in Table 1.

Serological and molecular assays

Of the 713 clinical samples screened by CMIA, five were reactive to HTLV-1/2. After confirmation by WB analysis, only 3 samples were indicative of an HTLV-1 infection, which is equivalent to a seroprevalence of 0.42%.

The results of the PCR analyses, for which the template was the proviral DNA obtained from the 713 PBMC samples, showed that all 5 samples determined to be CMIA-positive for HTLV-1 were also PCR-positive and corresponded to a molecular prevalence of infection of 0.7%. The electrophoretic profile of the 336-bp fragment amplified by PCR for each HTLV-1-positive sample is shown in Figure 1.

The demographic and epidemiological data were compared between the PCR-determined HTLV-1-positive and HTLV-1-negative pregnant women groups. The average age of virus-positive women was 25.6 ± 8.2 years (16-38), and the average age of virus-negative women was 24.4 ± 6.2 years with no significant difference between the ages ($p=0.60$). Furthermore, no significant differences were found in any of the other analyzed variables (age, ethnicity, marital status, educational level, family income, first sexual intercourse, prior pregnancy, breastfeeding, use of intravenous drugs by partner, or use of condoms) (Table 2).

In the PCR-determined HTLV-1-positive group, all women were residents of the metropolitan area of São Luis (4 of São Luís and 1 of Paço do Lumiar). Sociodemographic data showed that most of these women were mulattos (3/5-60.0%), were married or in a stable relationship (3/5-60.0%), possessed formal education equal to or higher than high school (3/5-60.0%), and had a monthly family income of less than 1 minimum wage (3/5-60.0%). We also observed that the women started sexual activities at 16 years of age or younger (3/5-60.0%) and were in their first pregnancy (3/5-60.0%), and they all had a fixed sexual partner. One pregnant woman reported receiving a blood transfusion. Among the HTLV-1-positive pregnant women who had had previous pregnancies, two breastfed their children, and one breastfed for more than six months (Table 2).

Sensitivity and specificity tests

The results of the sensitivity test with primers evaluated in the present study showed a detection limit of 37.5 ng of HTLV-1 proviral DNA (data not shown). No viral genetic material was amplified in 708 samples that were determined to be serologically negative by CMIA.

Sequencing of the amplified HTLV-1 fragment

The sequencing of the purified PCR products used to confirm the results showed that all amplified samples were positive for HTLV-1. The analysis of the alignment of the sequences of the 336-bp fragments of the *tax* gene region assessed in the present study showed 97 to 98% similarity with different nucleotide sequences of HTLV-1 in GenBank databases. These sequences were deposited in GenBank under accession numbers MN309698, MN309699, MN309700, MN309701, and MN309702.

4. Discussion

The infections caused by HTLV-1/2 remain a largely overlooked public health problem in Brazil, as these infections are usually asymptomatic and may go unnoticed by the carriers of the virus and by some health professionals; thus, HTLV-1/2 may be silently disseminated in the population [23]. Most studies that have been carried out in Brazil employed blood donors as the target population, of which men represent the majority [24]. A seroepidemiological survey carried out in blood banks of the 27 Brazilian capitals showed a regional prevalence of HTLV-1/2 infection ranging from 0.04% to 1.0%; the prevalence was higher in the North and Northeast regions and lower in the South region. Among the capitals analyzed, São Luis (Maranhão) had the highest incidence of HTLV-1/2 (1.0%) followed by Salvador (Bahia) (0.94%), both of which are capitals in the Northeast region [12]. São Luis and Salvador have high numbers of HTLV carriers [12,25]. The regional variation in the prevalence of HTLV-1/2 in Brazil can be explained by the different ethnic characteristics of its population [14,26]. The North and Northeast regions have a higher percentage of African and Amerindian descendants than the South region [24].

The prevalence of HTLV-1/2 infection is higher among women [8,27], with pregnant women being the group that best represents the general population; unlike blood donors [5]. Women have an important role in the transmission chain because they can transmit the virus to their children, mainly through breastfeeding [6]. However, studies in Brazil that assess the infection by HTLV-1/2 in pregnant women are still scarce and isolated [24], and notably few such studies have been conducted in Maranhão.

As with blood donors, there is a significant regional heterogeneity in the seroprevalence of infection by HTLV-1/2 in Brazilian pregnant women, with variations ranging from 0.0% in the western Amazon [28] to approximately 1.0% in the state of Bahia [29,30]. In the present study, a seroprevalence of HTLV-1 of 0.42% was found by WB analysis, indicating that the metropolitan area of São Luis is the region with the fourth largest seroprevalence among

pregnant Brazilian women. This seroprevalence is almost twofold higher than that found among blood donors (0.15%) [31] and is highly similar to that found in a previous study in pregnant women in this region [26]. In Europe, a multinational study observed a seroprevalence of HTLV-1/2 infection six times higher in pregnant women than in blood donors, despite different prevalence rates among countries [32]. Variations of seroprevalence among pregnant women are found even in Africa, which is considered the area most endemic for HTLV-1 worldwide, as well as the place of origin of human retroviruses, with variations from ranging 0.2% in South Africa to 5.5% in Nigeria [5].

In recent years, molecular methods for the diagnosis of different types of infectious agents have revolutionized diagnostic medicine because of their high sensitivity, specificity, and rapidity [33]. This study is the first to use PCR as a molecular diagnostic screening method for HTLV-1 in pregnant Brazilian women, while previous studies have used this technique only as a confirmatory and discriminatory test [26, 30, 34 - 39]. In the present study, the PCR technique detected a prevalence of 0.7% (5/713) of HTLV-1 in the pregnant women who were analyzed. This prevalence is similar to that found in Bahia, which presents the highest incidence in pregnant women in the Brazilian literature [30, 34].

Only the presence of HTLV-1 was detected in the present study. Previous research performed in pregnant women [26] and blood donors in Maranhão [40] also detected the presence of HTLV-1 and HTLV-2, indicating that HTLV-2 is disseminated in the Maranhão population. It is of fundamental importance to know which type of HTLV is involved in the infection because HTLV-1 is the most pathogenic and is related to severe diseases, such as ATLL and HAM/TSP [2].

We observed that the average age of the 5 pregnant women who tested positive for HTLV-1 by CMIA and PCR was 25.6 years, which is in keeping with the findings reported by other authors [26, 34, 37, 41, 42]. However, a population-based study in Bahia's capital found a high number of seropositive women older than 50 years of age [25].

Factors related to poverty, such as lower income and lower education levels, may be associated with HTLV-1 infection, suggesting that these factors can influence the transmission and maintenance of the virus in the population [7, 27]. This influence was not observed in the present study, as no association was found between HTLV-1 infection and family income or schooling. These data are consistent with the findings of previous studies conducted in the states

of Bahia [29, 30] and Rio de Janeiro [41]. However, Ribeiro et al. [43] and Nunes et al. [25] reported conflicting data.

We found that 60.0% of the HTLV-1-infected women reported beginning sexual intercourse at or below 16 years of age. The early initiation of sexual intercourse among young women may increase the risk of contracting sexually transmitted infections, which also becomes a risk factor for HTLV-1/2 infection [44].

Sexual and vertical transmission are the main routes of HTLV-1 [45]. A population study carried out in Salvador, Bahia, concluded that sex might have been the main route of HTLV-1 infection in the evaluated population [25]. Thus, the increased risk of women acquiring HTLV infection may be related to the higher effectiveness of transmission from men to women and may be associated with a history of sexually transmitted diseases and mucosal lesions, which would increase the chances of transmission by cell-cell contact [46].

Other high-risk behaviors can increase the likelihood of the sexual transmission of HTLV, such as having multiple sexual partners and not using condoms during sex [47]. This study revealed that all of the infected women had a fixed sexual partner. Although 80.0% of these women affirmed that they occasionally or never used condoms during sex, these data agree with those reported for Rio de Janeiro, where most of the infected pregnant women did not use condoms [41].

HTLV-1 infection was higher among primigravidae (3/5 – 60.0%), in contrast to data reported by Oliveira and Avelino [35], Figueiró-Filho et al. [36], and Sequeira et al. [47], who observed a higher number of infected pregnant women with multiple pregnancies in Goiás, Mato Grosso, and Pará, respectively.

In the present study, 50% (1/2) of the infected women who had previous pregnancies breastfed their children for more than 6 months. Although no significant differences were observed between the HTLV-1-positive and HTLV-1-negative groups, prolonged breastfeeding for more than 6 months is a risk factor for HTLV-1/2 infection [6, 45] because vertical transmission can occur in approximately 20% of children breastfed by infected women [6]. Additionally, vertical transmission is also a risk factor for the development of HTLV-1-related diseases [27]. In Japan, the vertical transmission of this virus was significantly reduced by prenatal screening for HTLV-1/2 and by counseling seropositive mothers to avoid breastfeeding [6].

Statistical analysis showed no *significant difference between* the PCR-determined HTLV-1-positive and HTLV-1-negative groups after analysis of the sociodemographic variables and epidemiological data analyzed. These results are in keeping with studies carried out in Bahia [29, 30] and Rio de Janeiro [41]. The high prevalence of HTLV-1 observed in this study, as well as the similarity of sociodemographic and epidemiological profiles between the groups, demonstrate the need for HTLV-1/2 screening in routine prenatal care for pregnant women, as suggested by other researchers [26, 29, 30, 37, 41].

In conclusion, the results obtained through both serological and molecular screening showed a high prevalence of HTLV-1 infection in pregnant women residing in the metropolitan area of São Luis - MA. These data highlight the extent of the problem and demonstrate that this metropolitan area is among the Brazilian capitals with the highest HTLV-1 prevalence in pregnant women. The high prevalence of HTLV-1 infection in the studied pregnant women demonstrates a need for the implementation of public health measures for the control and prevention of this infection in our population. As there is no cure, vaccine, or specific treatment for HTLV infection and its associated diseases to date, prevention is the best option to combat the spread of this virus. However, to this end, it is necessary to adopt effective public policies, including educating the population and health professionals. In addition, it is essential to incorporate HTLV-1/2 screening during the prenatal care of pregnant women, to provide free milk formula to the children of infected mothers, and to make notification of this infection compulsory.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA, under grant number 03382/13). The authors would like to thank the staff of the LACEN-MA for collecting the blood samples and performing the serological tests for HTLV, and the authors are also grateful to the pregnant women who agreed to participate in this study, making this research possible.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. ICTV (2013) International Committee on Taxonomy of Viruses. Available in: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Accessed: November 2018.

2. Szczypinska EM, Wallace MR, Wainscoat B, Salas CM, Rich JD (2015). Human T-Cell Lymphotropic Viruses review. Medscape. Available in: <http://emedicine.medscape.com/article/219285-overview#showall>. Accessed: October 2018.
3. Calattini S, Chevalier AS, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2:31-34. doi: 10.1186/1742-4690-2-30.
4. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7994-7999. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501734102>.
5. Gessain A, Cassar O (2012). Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol* 3:388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>.
6. Hino S (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87:152-166. doi: 10.2183/pjab.87.152.
7. Carneiro-Proietti AB, Amaranto-Damasio MS, Leal-Horiguchi CF, Bastos RHC, Seabra-Freitas G, Borowiak DR, et al. (2014). Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3 (Suppl 1): S24-S29. doi: 10.1093/jpids/piu070.
8. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araújo MG, Pinheiro SR, Carneiro-Proietti ABF (2010). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin Microbiol Reviews* 23:577–589. doi:10.1128/CMR.00063-09.
9. Caterino-de-Araujo A, Sacchi CT, Gonçalves MG, Campos KR, Magri MC, Alencar WK, et al. (2015). Current prevalence and risk factors associated with HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Human Retrovir* 31: 543-549. doi:10.1089/AID.2014.0287.
10. Caterino-de-Araujo A, Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC (2018). Making the invisible visible: searching for human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Brazilian patients with viral hepatitis B and C. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113: 130-134. doi:10.1590 / 0074-02760170307.
11. Carneiro-Proietti AB, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, et al. (2002). Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:499-508. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822002000500013>.

12. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA (2005). Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Heterogeneous geographical distribution of Human T Cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-1/2): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban áreas in Brazil. *Cad Saúde Pública* 21:926-931. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2005000300027>.
13. Nascimento LB, Carneiro MAS, Teles AS, Lopes CLR, Reis NRSR, Silva AMS, et al. (2009). Prevalence of infection due to HTLV-1 in remnant quilombos in Central Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 657-660. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000600009>.
14. Paiva A, Casseb J (2015). Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Rev Inst Med Trop* 57:1- 13. doi:10.1590/S0036-46652015000100001.
15. Sabino EC, Carvalho SMF (2015). Diagnóstico Laboratorial do HTLV. In: Carneiro-Proietti ABF (Org). *Cadernos Hemominas. HTLV*. Belo Horizonte, 6ª ed., 16: p.73-83.
16. Cassar O, Gessain A (2017). Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. *Methods Mol Biol* 1582:3-24. doi: 10.1007/978-1-4939-6872-5-1.
17. Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, et al. (2017). Proviral features of human T cell leukemia virus type 1 in carriers with indeterminate Western blot analysis results. *J Clin Microbiol* 55:2838–2849. doi:10.1128/JCM.00659-17.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 pp., ISBN 0-87969-309-6.
19. Sanger F, Nickelen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.
20. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
21. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
22. SPSS 20 (2011). IBM SPSS statistics base 20. Chicago, IL: SPSS Inc.
23. Zihlmann KF, Alvarenga AT, Casseb J (2012). Living Invisible: HTLV-1-Infected Persons and the Lack of Care in Public Health. *PLoS Negl Trop Dis* 6: 1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001705>.

24. Barmpas DBS, Monteiro DLM, Taquette SR, Trajano AJB, Raupp RM, Miranda FRD, et al. (2014). HTLV-1/2 infection in Brazilian pregnant women. *Rev HUPE* 13: 81-88. doi: 10.12957/rhupe.2014.12132.
25. Nunes D, Boa-Sorte N, Grassi MFR, Taylor GP, Teixeira MG, Barreto ML, et al. (2017). HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS ONE* 12:1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171303>.
26. Souza VG, Martins ML, Carneiro-Proietti ABF, Januário JN, Ladeira RVP, Silva CMS, et al. (2012). High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:159-162. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000200004>.
27. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058-6068. doi:10.1038/sj.onc.1208968.
28. Machado Filho AC, Sardinha JFJ, Ponte RL, Costa EP, da Silva SS, Martinez-Espinosa FE (2010). Prevalence of infection for HIV, HTLV, HBV and of syphilis and chlamydia in pregnant women in a tertiary health unit in the western Brazilian Amazon region. *Rev Bras Ginecol e Obstet* 32:176-183. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032010000400005>.
29. Magalhães T, Mota-Miranda AC, Alcantara LC, Olavarria V, Galvão-Castro B, Rios-Grassi MF (2008). Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. *J Med Virol* 80:2040–2045. <https://doi.org/10.1002/jmv.21278>.
30. Mello MAG, Conceição AF, Sousa SMB, Alcântara LC, Marin LJ, Raiol MRS, et al. (2014). HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. *Virol J* 11: 28. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-28>.
31. Viana GMC, Nascimento MDSB, Oliveira RAS, Santos AC, Galvão CS, Silva MACN (2014). Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 36:50-53. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20140013>.
32. Taylor GP, Bodeus M, Courtois F, Pauli G, Del Mistro A, Machuca A, et al. (2005). The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses: types I and II in Europe: a prospective study of pregnant women. *J Acq Immun Def Synd* 38:104–109.
33. Messacar K, Parker SK, Todd JK, Dominguez SR (2017). Implementation of Rapid Molecular Infectious Disease Diagnostics: the Role of Diagnostic and Antimicrobial Stewardship. *J Clin Microbiol* 55:715- 723. doi:10.1128/JCM.02264-16.

34. Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB, Santos M, Valadão E, Alcantara LC, Galvão-Castro B (2001). Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26:490-494. doi: 10.1097/00126334-200104150-00016.
35. Oliveira SR, Avelino MM (2006). Human T-cell lymphotropic virus type I seroprevalence among pregnant women in Goiânia, GO, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 28:467-472. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-72032006000800005>.
36. Figueiro'-Filho EA, Senefonte FRA, Lopes AHA, De Moraes OO, Souza Junior VG, Maia TL, et al. (2007). Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:181-187. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000200007>.
37. Dal Fabbro MM, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas, GMB, et al. (2008). HTLV 1/2 infection: prenatal performance as a disease control strategy in State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:148-151. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000200003>.
38. Medeiros ACM, Vidal LRR, Von Linsingen R, Ferin NA, Bessani Strapasson T, Almeida SM, et al. (2017). Confirmatory molecular method for HTLV-1/2 infection in high-risk pregnant women. *J Med Virol* 90:998-1001. <https://doi.org/10.1002/jmv.25014>.
39. Guerra AB, Siravenha LQ, Laurentino RV, Feitosa RNM, Azevedo VN, Vallinoto ACR, et al. (2018). Seroprevalence of HIV, HTLV, CMV, HBV and rubella virus infections in pregnant adolescents who received care in the city of Belém, Pará, Northern Brazil. *BMC Pregnancy and Childbirth* 18:1-7. doi:10.1186/s12884-018-1753-x.
40. Viana GMC, Silva MACN, Souza VL, Lopes NBS, Nascimento MDSB (2015). Endemic transmission of HTLV-2 in blood donors from São Luís do Maranhão, northeastern Brazil: report of two asymptomatic individuals. *Rev Bras Hematol Hemoter* 37: 130-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2014.11.003>.
41. Monteiro DLM, Taquette SR, Barmpas DBS, Rodrigues NCP, Teixeira SAM, Villela LHC, et al. (2014). Prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women living in the Metropolitan area of Rio de Janeiro. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e3146:1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003146>.
42. Moura AA, Mello MJG, Correia JB (2015). Prevalence of syphilis, human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and human T-lymphotropic virus infections and

coinfections during prenatal screening in an urban Northeastern Brazilian population. *Int J Infect Dis* 39:10-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.07.022>.

43. Ribeiro MA, Proietti FA, Martins ML, Januário JN, Ladeira RV, Oliveira MF, et al. (2010). Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening, Minas Gerais, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 27: 330–337. doi: 10.1590/S1020-49892010000500002.

44. Olbrich Neto J, Meira DA (2004). Soroprevalence of HTLV-I/II, HIV, syphilis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu - São Paulo - Brazil: risk factors HTLV-I/II infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 37:28–32. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000100008>.

45. Paiva AM, Assone T, Haziot MEJ, Smid J, Fonseca LAM, Luiz OC, et al. (2018). Risk factors associated with HTLV-1 vertical transmission in Brazil: longer breastfeeding, higher maternal proviral load and previous HTLV-1-infected offspring. *Scientific Reports* 8:1-6. doi: 10.1038/s41598-018-25939-y.

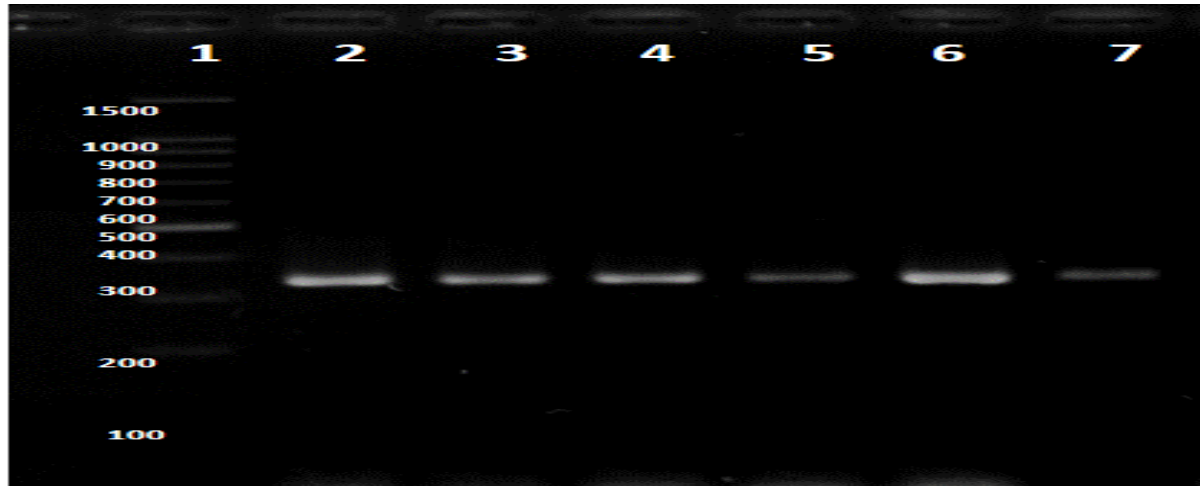
46. Paiva A, Casseb J (2014). Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:265-274. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0232-2013>.

47. Sequeira CG, Tamegão-Lopes BP, Santos EJ, Ventura AM, Moraes-Pinto MI, Succini RCM (2012). Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the state of Pará, Northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:453–456. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012005000007>.

Table 1. Sociodemographic characteristics of 713 pregnant women analyzed in this study.

Characteristics	number	%
Age (years)		
15 - 30	595	83.5
31 - 45	118	16.5
Ethnicity		
White	116	16.3
Black	142	19.9
Mulatto	455	63.8
Place of residence		
Metropolitan area	679	95.2
Other municipalities	34	4.8
Marital status		
Single	191	26.8
Married/stable union	512	71.8
Divorced/ separated	10	1.4
Educational level		
< Full high school	273	38.3
≥ Full high school	440	61.7
Occupation		
Unemployed	140	19.6
Paid employment	186	26.1
Retired / pensioner	4	0.6
Works at home	383	53.7
Previous pregnancy		
Yes	406	56.9
No	307	43.1
Family income (minimum wages)		
< 1	185	25.9
1 - 3	513	72.0
> 3	15	2.1
Residents per household		
1 - 3 people	354	49.6
4 - 6 people	307	43.1
> 6 people	52	7.3
Total	713	100.0

Figure 1. Profiles of HTLV-1 obtained by PCR amplification of the proviral DNA extracted from peripheral blood mononuclear cells.



Caption: Profiles of HTLV-1 in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Line 1: Molecular standard 100 bp DNA ladder (Promega, USA); Line 2: HTLV-1 positive control (isolate profile in MT2); Lines 3-7: HTLV-1 profile of clinical samples.

Table 2. Sociodemographic and epidemiological variables of HTLV-1 positive and negative pregnant women in serological and molecular methods.

Variables	HTLV-1 positive n=5 / n (%)	HTLV-1 negative n=708 / n (%)	p-value**
Age (years)			0.33
15 – 30	3 (60.0)	592 (83.6)	
31 – 45	2 (40.0)	116 (16.4)	
Ethnicity			0.23
White	0 (0.0)	116 (16.4)	
Black	2 (40.0)	140 (19.8)	
Mulatto	3 (60.0)	452 (63.8)	
Marital status			0.45
Single	2 (40.0)	189 (26.7)	
Married/ stable union	3 (60.0)	509 (71.9)	
Divorced/ separated	0 (0.0)	10 (1.4)	
Educational level			0.71
< Full high school	2 (40.0)	275 (38.8)	
≥ Full high school	3 (60.0)	433 (61.2)	
Family income (MW)			0.21
< 1	3 (60.0)	182 (25.7)	
1 – 3	1 (20.0)	512 (72.3)	
> 3	1 (20.0)	14 (2.0)	
First intercourse (years)			1.00
≤16	3 (60.0)	394 (55.6)	
>16	2 (40.0)	314 (44.4)	
Previous pregnancy			0.47
Yes	2 (40.0)	404 (57.0)	
No	3 (60.0)	304 (43.0)	
Breastfeeding (months)*			0.75
≤ 6	1 (50.0)	134 (33.2)	
> 6	1 (50.0)	270 (66.8)	
Partner's intravenous drug use			0.76
Yes	0 (0.0)	26 (3.7)	
No	5 (100.0)	682 (96.3)	
Condom use			0.14
Never	2 (40.0)	198 (28.0)	
Occasionally	2 (40.0)	390 (55.1)	
Always	1 (20.0)	120 (16.9)	

Caption: MW – Minimum wages. * In the analysis of the variable breastfeeding, only volunteers with previous pregnancies were considered. ** Fischer's exact test. The significance level adopted by 5%.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da infecção pelo HTLV em humanos ter sido descoberta a quase quarenta anos, antes mesmo do surgimento do HIV, esta doença é considerada extremamente negligenciada, tanto pela Organização Mundial de Saúde - que não a incluiu na sua lista de doenças negligenciadas, quanto pelo Ministério da Saúde do Brasil que ainda não a incluiu na sua lista nacional de doenças de notificação compulsória. Ou seja, este é um sério e grave problema de saúde pública, não só do Brasil, mas mundial que precisa ser solucionado com maior conhecimento sobre a infecção e doenças associadas a este vírus, além da implantação de medidas de saúde pública para controle e prevenção, já que a infecção pelo HTLV não tem cura nem tratamento.

O HTLV pertence à mesma família do HIV, com as mesmas formas de contágio, porém diferentemente do HIV que destrói o sistema imunológico, o HTLV pode levar a sua proliferação, podendo causar um tipo grave e fatal de leucemia, além de problemas sistêmicos como disfunção erétil, incontinência urinária, depressão e problemas neurológicos que podem afetar diretamente a qualidade de vida dos indivíduos infectados. Além disso, esta infecção possui características importantes como agregação familiar, podendo famílias inteiras estarem infectadas e não terem o conhecimento de sua condição sorológica, e apresenta maior prevalência entre as mulheres.

Esta pesquisa demonstrou a importância da triagem mandatória do HTLV-1/2 no pré-natal das gestantes maranhenses, uma vez que todas as medidas de prevenção da transmissão vertical dependem do conhecimento sorológico da mãe para o HTLV. Além disso, as regiões Norte e Nordeste são as regiões mais prevalentes para o HTLV, e o Maranhão, assim como a Bahia provavelmente são os Estados de maior prevalência deste vírus. Entretanto, o Estado da Bahia já possui políticas públicas de prevenção para esta infecção e vários estudos sobre este vírus em sua população, enquanto, o Maranhão possui pouquíssimos estudos, e os existentes abordaram principalmente doadores de sangue. Além disso, não possui políticas públicas de combate a este vírus, mesmo com esta infecção podendo causar sérios agravos à saúde.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ARAÚJO, A.Q.C.; LEITE, A.C.C.; LIMA, M.A.S.D.; SILVA, M.T.T. When to suspect and when to order a diagnostic test for HTLV-1 infection? **Arq Neuropsiquiatr**, v. 67, n.1, p.132-138, 2009.
- BAGHERI, F.; PATEL, K.; SAMOURJIAN, E.; PATHAK, N.; SHAMALOV, V.; GINTAUTAS, J.; SANTUCCI, T. Further evidence that HTLV protects against HIV-1 progression. **Infect Med J**, p. 1-5, 2008.
- BANGHAM, C.R; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, p. 6035-6046, 2005.
- BARMPAS, D.B.S.; MONTEIRO, D.L.M.; TAQUETTE, S.R.; TRAJANO, A.J.B.; RAUPP, R.M.; MIRANDA, F.R.D., et al. Infecção pelo HTLV-1/2 em gestantes brasileiras. **Rev HUPE**, v. 13, n. 3, p. 81-88, 2014.
- BEILKE, M.A. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. **AIDS Res Human Retroviruses**, v. 28, p.139-147, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Guia de manejo clínico do paciente com HTLV. Ministério da Saúde, 41 p. Normas e Manuais Técnicos – (Série Manuais; n.3 –CN-DST e Aids); 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Guia de manejo clínico da infecção pelo HTLV. Ministério da Saúde, 77 p. Normas e Manuais Técnicos – (Série Manuais; n.4 –CN-DST e Aids); 2013.
- Brites, C.; SAMPAIO, J.; OLIVEIRA, A. HIV-1/Human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. **AIDS Rev**, v. 11, n.1, p. 8-16, 2009.
- CAO, S.; MALDONADO, J.O.; GRIGSBY, I.F.; MANSKY, L.M.; ZHANG, W. Analysis of human T-cell leukemia virus type 1 particles by using cryo-electron tomography. **Journal of virology**, v. 89, n. 4, p. 2430-2435, 2015.
- CALATTINI, S.; CHEVALIER, A.S.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v.2, p. 31-34, 2005.
- CAMPBELL, J.H.; HEARPS, A.C.; MARTIN, G.E.; WILLIAMS, K.C.; CROWE, S.M. The importance of monocytes and macrophages in HIV pathogenesis, treatment, and cure. **AIDS**, v.28, p. 2175–2187, 2014.
- CAMPOS, K.R.; GONÇALVES, M.G.; FUKASAWA, L.O.; COSTA, N.A.; BARRETO-DAMIÃO, C.H.; MAGRI, M.C., et al. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-

1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 57-65, 2015.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F.A.; INTERDISCIPLINARY HTLV-I/II RESEARCH GROUP (GIPH). Human T Cell Lymphotropic Viruses (HTLV-I/II) in South America: Should It Be a Public Health Concern? **J Biomed Sci**, v. 9, p. 587-595, 2002b.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; RIBAS, J.G.R.; CATALAN-SOARES, B.C.; MARTINS, M.L.; BRITO-MELO, G.E.A.; MARTINS-FILHO, A.O., et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n.5, p. 499-508, 2002a.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; SABINO, E.C.; LEÃO, S.; SALLES, N.A.; LOUREIRO, P.; SARR, M., et al. Human T-lymphotropic virus type I and type II seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n.10, p. 1265-1272, 2012.

CARRAZONE, C.F.V.; BRITO, A.M.; GOMES, Y.M. A importância de avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 26, p.93-98, 2004.

CASOLI, C.; PILOTTI, E.; BERTAZZONI, U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. **AIDS Rev**, v. 9: 140-149, 2007.

CASSAR, O.; CAPUANO, C.; MEERTENS, L.; CHUNGUE, E.; GESSAIN, A. Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Molecular Variants, Vanuatu, Melanesia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 706-710, 2005.

CATALAN-SOARES, B., CARNEIRO-PROIETTI, A.B., PROIETTI, F.A. Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Heterogeneous geographical distribution of Human T Cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-1/2): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban áreas in Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 21, p. 926-931, 2005.

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; ALVES, F.A.; CAMPOS, K.R.; LEMOS, M.F.; MOREIRA, R.C. Making the invisible visible: searching for human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Brazilian patients with viral hepatitis B and C. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 130-134, 2018.

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; SACCHI, C.T.; GONÇALVES, M.G.; CAMPOS, K.R.; MAGRI, M.C.; ALENCAR, W.K., et al. Current prevalence and risk factors associated with HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. **AIDS Res Human Retrovir**, v. 31, n. 5, p. 543-549, 2015.

DAL FABBRO, M.M.; CUNHA, R.V.; BÓIA, M.N.; PORTELA, P.; BOTELHO, C.A.; FREITAS, G.M.B., et al. HTLV 1/2 infection: prenatal performance as a disease control strategy in State of Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 2, p.148-151, 2008.

DE OLIVEIRA, E.H.; OLIVEIRA-FILHO, A.B.; SOUZA, L.A.; SILVA, L.V.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A.C.R. 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**, v.10, n. 8, p. 700–707, 2012.

DIAS-BASTOS, M.R.; OLIVEIRA, C.D.L.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Decline in prevalence and asymmetric distribution of human T cell lymphotropic virus 1 and 2 in blood donors, State of Minas Gerais, Brazil, 1993 to 2007. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 6, p. 615-619, 2010.

DOUGAN, S.; SMITH, A.; TOSSWILL, J.C.; DAVISON, K.; ZUCKERMAN, M.; TAYLOR, G.P. New diagnoses of HTLV infection in England and Wales: 2002–2004. **EuroSurveillance**, v. 10, p. 232–235, 2005.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L.C.; BARRETO, M.L; DA GLORIA TEIXEIRA, M; GALVÃO-CASTRO, B. "HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics." **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n.5, p.527-531, 2003.

FEUER, G.; GREEN, P. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5996-6004, 2005.

FIGUEIRO-FILHO, E.A.; SENEFFONTE, F.R.A.; LOPES, A.H.A.; DE MORAIS, O.O.; SOUZA JUNIOR, V.G.; MAIA, T.L., et al. Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 181–187, 2007.

FUTSCH, N; MAHIEUX, R.; DUTARTRE, H. HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. **Viruses**, v.10, n. 1, 2018.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIGUES, L.G.; SERENO, A.; FERREIRA JÚNIOR, O.C.; FRANCO, L.G., et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v.37, n.2, p. 242-243, 1997.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Front Microbiol**, v. 3, p. 388, 2012.

GESSAIN, A.; GALLO, R.C.; FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **J Virol**, v. 66, p. 2288-2295, 1992.

GESSAIN, A.; YANAGIHARA, R.; FRANCHINI, G., GARRUTO, R.M.; JENKINS, C.L.; AJDUKIEWICZ, A.B., et al. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p.7694–7698, 1991.

GLASER, J.B.; LEVIS, W.R.; GRUBER, T.; CABRERA, A.; POIESZ, B.J. Prevalence of human T cell lymphotropic virus (HTLV) types I and II and human immunodeficiency

virus type 1 infections among persons with Hansen's disease in New York City. **J Infect Dis**, v. 170, n. 4, p.1007-1009, 1994.

GONÇALVES, D.U.; PROIETTI, F.A.; RIBAS, J.G.R.; ARAÚJO, M.G.; PINHEIRO, S.R.; CARNEIRO- PROIETTI, A.B.F. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. **Clin Microbiol Reviews**, v. 23, n. 3, p. 577–589, 2010.

GOTUZZO, E.; MOODY, J.; VERDONCK, K.; CABADA, M.M.; GONZÁLEZ, E.; DOOREN, S.V.; VANDAMME, A.M.; TERASHIMA, A.; VERMUND, S.H. Frequent HTLV-1 infection in the offspring of Peruvian women with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis or strongyloidiasis. **Rev Panam Salud Publica**, v. 22, p. 223-230, 2007.

GUERRA, A.B.; SIRAVENHA, L.Q.; LAURENTINO, R.V.; FEITOSA, R.N.M.; AZEVEDO, V.N.; VALLINOTO, A.C.R., et al. Seroprevalence of HIV, HTLV, CMV, HBV and rubella virus infections in pregnant adolescents who received care in the city of Belém, Pará, Northern Brazil. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 18, n. 169, p. 1-7, 2018.

HINO, S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**, v. 87, n. 4, p.152-166, 2011.

HORIGUCHI, C.L.F.; DAMASIO, M.A.S.; BASTOS, R.H.C.; FREITAS, G.S.; BOROWIAK, D.R.; SANTOS, M.M., et al. Transmissão do HTLV-1/2 em grupos familiares: possíveis vias de contaminação. **Rev Med Minas Gerais**, v. 24 (Supl 6), S33-S39, 2014.

ICTV- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2013. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso: Novembro de 2017.

ISHAK, R.; VALLINOTO, A.C.; AZEVEDO, V.N.; VICENTE, A.C.; HALL, W.W.; ISHAK, M.O. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. **Epidemiol Infect**, v. 135, p.604-609, 2007.

KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE, D.; GALLO, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KANNIAN, P.; YIN, H.; DOUEIRI, R.; LAIRMORE, M.D.; FERNANDEZ, S.; GREEN, P.L. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 3757–3766, 2012.

KILTAGAWA, T; FUJISHITA, M.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I.; TADOKORO, H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **JAMA**, v. 256, n. 17, p. 2342, 1986.

KROON, E.G.; PROIETTI, A.B.F.C. HTLV-1/2 - O vírus, sua multiplicação e estrutura genômica. In: CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. (Org). **Cadernos Hemominas**. HTLV, v. 16, 6ª ed., Belo Horizonte, p. 15-27, 2015.

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**, v. 55, p.2838–2849, 2017.

LAIRMORE, M.D.; FRANCHINI, G. Retroviridae: Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2. In: Fields Virology, 5ª ed. Eds. Knipe, D.M.; Howley, P.M. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, v. 2, p. 2072-2105, 2007.

LI, H.C.; BIGGAR, R.J.; MILEY, W.J.; MALONEY, E.M.; CRANSTON, B.; HANCHARD, B., et al. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. **J Infect Dis**, v. 190, n. 7, p. 1275–1278, 2004.

LIMA, M.A.; BICA, R.B.; ARAUJO, A.Q. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 76, p. 294-296, 2005.

LIMA, L.H.; VIANA, M.C. Prevalence and risk factors for HIV, syphilis, hepatitis B, hepatitis C, and HTLV-I/II infection in low-income postpartum and pregnant women in Greater Metropolitan Vitória, Espírito Santo State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 25, n. 3, p. 668–676, 2009.

LOUREIRO, P.; LOPES, M.S.S.N. Leucemia/ linfoma de células T do adulto (ATL). In: CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. (Org). **Cadernos Hemominas**. HTLV, v. 16, 6ª ed., Belo Horizonte, p.181-230, 2015.

MAGALHÃES, T.; MOTA-MIRANDA, A.C.; ALCANTARA, L.C.; OLAVARRIA, V.; GALVÃO-CASTRO, B.; RIOS-GRASSI, M. F. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. **J Med Virol**, v. 80, n. 11, p. 2040–2045, 2008.

MANEL, N.; KIM, F.J.; KINET, S.; TAYLOR, N.; SITBON, M.; BATTINI, J.L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell**, v. 115, p. 449-459, 2003.

MANNS, A.H.; GRENADE, L. Seminar: Human T-Lymphotropic Vírus Type I Infection. **The Lancet**, v. 353, p. 1951-1956, 1999.

MARTIN, J.L.; MALDONADO, J.O.; MUELLER, J.D.; ZHANG, W.; MANSKY, L.M. Molecular studies of HTLV-1 replication: An Update. **Viruses**, v. 8, n. 31, p. 1-22, 2016.

MARTINS, M.L.; SOUZA, J.G.; FRANCO, G.M.; SANTOS, D.M.S.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Patogênese da infecção pelo HTLV. In: CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. (Org). **Cadernos Hemominas**. HTLV, v. 16, 6ª ed., Belo Horizonte, p. 28-72, 2015.

MATEOS, A.V.; ECHEVARRÍA, A.A.; BAZACO, J.M.; ARIN, I.A.; EGURROLA, J.A.Z.; PEÑA, C.P. Infección por HTLV Post-trasplante Renal. **Arch Esp Urol**, v. 58, p. 1064-1068, 2005.

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, n. 27, p. 1-13, 2005.

MATSUOKA, M.; GREEN, P.L. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, n.71, p. 1-8, 2009.

MEDEIROS, A.C.M.; VIDAL, L.R.R.; VON LINSINGEN, R.; FERIN, A.N.; BESSANI STRAPASSON, T.; ALMEIDA, S.M., et al. Confirmatory molecular method for HTLV-1/2 infection in high-risk pregnant women. **J Med Virol**, v. 90, n. 5, p. 998-1001, 2017.

MELAMED, A.; WITKOVER, A.D.; LAYDON, D.J.; BROWN, R.; LADELL, K.; MINERS, K., et al. Clonality of HTLV-2 in natural infection. **PLoS Pathog**. 10:e1004006. doi: 10.1371/journal.ppat.1004006, 2014.

MELLO, M.A.G.; CONCEIÇÃO, A.F.; SOUSA, S.M.B.; ALCÂNTARA, L.C.; MARIN, L.J., RAIOL, M.R.S., et al. HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. **Virol J**, 11: 28. doi: 10.1186/1743-422X- 11-28, 2014.

MOENS, B.; LOPEZ, G.; ADAUI, V.; GONZALEZ, E.; KERREMANS, L.; CLARK, D., et al. Development and Validation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Genotyping and Human T-Lymphotropic Virus Type 1, 2, and 3 Proviral Load Determination. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 11, p. 3682-3691, 2009.

MONTEIRO, D.L.M.; TAQUETTE, S.R.; BARMAS, D.B.S.; RODRIGUES, N.C.P.; TEIXEIRA, S.A.M.; VILLELA, L.H.C., et al. Prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women living in the Metropolitan area of Rio de Janeiro. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 8, p. e3146: 1-5, 2014.

MOREIRA, E.D.JR.; RIBEIRO, T.T.; SWANSON, P.; SAMPAIO-FILHO, C.; MELO, A.; BRITES, C.; BADARÓ, R.; TOEDTER, G.; LEE, H.; HARRINGTON, W. Jr. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 6, n.8, p. 959-963.1993.

MORIUCHI, H., MORIUCHI, M. In vitro induction of HIV-1 replication in resting CD4+ T cells derived from individuals with undetectable plasma viremia upon stimulation with human T-cell leukemia virus type I. **Virology**, v. 278, n. 2, p. 514-519, 2000.

MOURA, A.A.; MELLO, M.J.G.; CORREIA, J.B. Prevalence of syphilis, human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and human T-lymphotropic virus infections and coinfections during prenatal screening in an urban Northeastern Brazilian population. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 39, p. 10-15, 2015.

MURPHY, E.L.; WANG, B.; SACHER, R.A.; FRIDEY, J.; SMITH, J.W.; NASS, C.C.; NEWMAN, B.; OWNBY, H.E.; GARRATTY, G.; HUTCHING, S.T.; SCHREIBER, G.B. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 1, p.109-116, 2004.

NASCIMENTO, L.B.; CARNEIRO, M.A.S.; TELES, S.A.; LOPES, C.L.R.; REIS, N.R.S.R.; SILVA, A.M.S., et al. Prevalência da infecção pelo HTLV-1, em remanescentes de quilombos no Brasil Central. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 657-660, 2009.

NUNES, D.; BOA-SORTE, N.; GRASSI, M.F.R.; TAYLOR, G.P.; TEIXEIRA, M.G.; BARRETO, M.L., et al. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-10, 2017.

OLBRICH NETO, J.; MEIRA, D.A. Soroprevalence of HTLV-I/II, HIV, syphilis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu - São Paulo - Brazil: risk factors HTLV-I/II infection. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 37, n. 1, p. 28-32, 2004.

OLIVEIRA, S.R.; AVELINO, M.M. Human T-cell lymphotropic virus type I seroprevalence among pregnant women in Goiânia, GO, Brazil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 28, n. 8, p. 467-472, 2006.

OO, Z.; BARRIOS, C.S.; CASTILLO, L.; BEILKE, M.A. High levels of cc-chemokine expression and downregulated levels of CCR5 during HIV-1/HTLV-1 and HIV-1/HTLV-2 coinfections. **J Med Virol**, v.87, n. 5, p. 790-797, 2015.

PAIVA, A.M.; ASSONE, T.; HAZIOT, M.E.J.; SMID, J.; FONSECA, L.A.M.; LUIZ, O.C., et al. Risk factors associated with HTLV-1 vertical transmission in Brazil: longer breastfeeding, higher maternal proviral load and previous HTLV-1-infected offspring. **Scientific Reports**, v. 8, n. 7742, p.1-6, 2018.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 3, p. 265-274, 2014.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. **Rev Inst Med Trop**, v. 57, n. 1, p.1- 13, 2015.

PANFIL, A.R.; AL-SALEEM, J.; HOWARD, C.M.; SHKRIBAI, N.; KVARATSKHELIA, M.; GREEN, P.L. Stability of the HTLV-1 Antisense-Derived Protein, HBZ, Is Regulated by the E3 Ubiquitin-Protein Ligase, UBR5. **Front Microbiol**, v. 9, n.80, p. 1-14, 2018.

PEDRAL-SAMPAIO, D.B.; MARTINS NETTO, E.; PEDROSA, C. BRITES, C.; DUARTE, M.; HARRINGTON, W. Jr. "Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. **Braz J Infect Dis**, v.1, n.1, p. 31-35, 1997.

PERCHER, F.; JEANNIN, P.; MARTIN-LATIL, S.; GESSAIN, A.; AFONSO, P.V.; VIDY-ROCHE A., et al. Mother-to-Child Transmission of HTLV-1: Epidemiological aspects, mechanisms and determinants of mother-to-child transmission. **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2016.

PINTO, M.T.; RODRIGUES, E.S.; TAKAYANAGUI, O.M.; UBIALI, E.M.A.; VALENTE, V.B.; AZEVEDO, R.; COVAS, D.T.; MALTA, T.M.; KASHIMA, S. HTLV-1/2

seroprevalence and coinfection rate in Brazilian first-time blood donors: an 11-year follow-up. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 54, n. 3, p.123-129, 2012.

PINTO, M.T.; SLAVOV, S.N.; VALENTE, V.B.; UBIALI, E.M.; COVAS, D.T.; KASHIMA, S. Evaluation of human T-lymphotropic virus prevalence/co-infection rates for a four-year period in a non-metropolitan blood center in southeast Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, p. 232–236, 2016.

PIQUET, C.; JONES, K.S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV. **Front Microbiol**, v. 3, p. 1-15, 2012.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. 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**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

PORTO, M.A.; MUNIZ, A.; OLIVEIRA-JUNIOR, J.; CARVALHO, E.M. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 641-649, 2002.

POSADA-VERGARA, M.P.; MONTANHEIRO P.; FUKUMORI, L.M.I.; BONASSER, F.; DUARTE, A.J.S.; OLIVEIRA, A.C.P.; CASSEB, J. Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) símile diagnosis in HIV-1-co-infected subjects. **Rev Inst Med Trop**, v. 48, p. 207-210, 2006.

PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES, B.C.; MURPHY, E.L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v.24, p.6058-6068, 2005.

PUCCIONI-SOHLER, M.; GRASSI, M.F.R.; GALVÃO-CASTRO, B.; CATERINO, A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; VICENTE, A.C.P., et al. Increasing awareness of human T-lymphotropic virus type-1 infection: a serious, invisible, and neglected health problem in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S003786822019000100915&script=sci_arttext. Acesso: Janeiro de 2020.

RATNER, L. Human T cell lymphotropic virus-associated leukemia/lymphoma. **Curr Opin Oncol**, v. 17, p. 469-473, 2005.

RIBEIRO, M.A.; PROIETTI, F.A.; MARTINS, M.L.; JANUÁRIO, J.N.; LADEIRA, R.V., OLIVEIRA, M.F., et al. Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening, Minas Gerais, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 27, n. 5, p. 330–337, 2010.

ROMANELLI, L.C.F.; CARAMELLI, P.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.C. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 3, p. 340-347, 2010.

ROSADAS, C.; TAYLOR, G.P. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet Research Needs. **Front Microbiol**, v. 10, n. 999, p. 1-18, 2019.

ROSADAS, C.; TOSSWILL, J.H.; TEDDER, R.; TAYLOR, G.P. Pregnancy does not adversely impact diagnostic tests for HTLV-1/2 infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v.13, n. 9, p. 1-7, 2019.

ROUCOUX, D.F.; WANG, B.; SMITH, D.; NASS, C.C.; SMITH, J., HUTCHING, S.T., et al. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. **J Infect Dis**, v. 191, n. 9, p.1490-1497, 2005.

SABINO, E.C.; CARVALHO, S.M.F. Diagnóstico Laboratorial do HTLV. In: CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. (Org). **Cadernos Hemominas**. HTLV, v. 16, 6ª ed., Belo Horizonte, p.73-83, 2015.

SALLES, N.A.; SABINO, E.C.; BARRETO, C.C.; BARRETO, A.M.; OTANI, M.M.; CHAMONE, D.F. The discarding of blood units and the prevalence of infectious diseases in donors at the Pro-Blood Foundation/Blood Center of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 13, p. 111-116, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p., 1989, ISBN 0-87969-309-6.

SANGER, F.; NICKELLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANGIOVANNI, R. INCT-DT amplia conhecimento da relação do HTLV-1 com muitas doenças. 2017. Disponível em: < www.edgardigital.ufba.br/?p=1727>. Acesso: Maio de 2018.

SANTOS, F.L.N.; LIMA, F.W.M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 2, p. 105-116, 2005.

SANTOS, E.L.; TAMEGÃO-LOPES, B.; MACHADO, L.F.A.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R.; LEMOS, J.A.R.; VALLINOTO, A.C.R. Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região Amazônica. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n.3, p. 271-276, 2009.

SCADDEN, D.T.; FREEDMAN, A.R.; ROBERTSON, P. Human T-lymphotropic virus type I: Virology, pathogenesis, and epidemiology. Disponível em: < www.uptodate.com/.../human-t-lymphotropic-virus-type-i-virolo>. Updated: Jun 21, 2016. Acesso: Novembro de 2017.

SCADDEN, D.T.; FREEDMAN, A.R.; ROBERTSON, P. Human T-lymphotropic virus type I: Disease associations, diagnosis, and treatment. Disponível em: < www.uptodate.com/.../human-t-lymphotropic-virus-type-i-disease...>. Updated: Oct 09, 2017. Acesso: Novembro de 2017.

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**, v. 80, n. 12, p. 3618-3622, 1983.

SEQUEIRA, C.G.; TAMEGÃO-LOPES, B.P.; SANTOS, E.J.; VENTURA, A.M.; MORAES-PINTO, M.I.; SUCCI, R.C.M. Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the state of Pará, Northern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 4, p. 453–456, 2012.

SERRA E SILVA, C.M.; SOUZA, V.G.; PIRES, C.M.; MARTINS, C.; GOMES, S.C. S.; MOCHEL, E.G. Prevalência de sorologia positiva para o HTLV-1 e HTLV-2 em gestantes atendidas em três serviços públicos de pré-natal, São Luís, Jul/08 a Jul/09. **Cadernos de Pesquisa** - Universidade Federal do Maranhão, v. 16, p. 39-44, 2009.

SHIMOTOHNO, K.; TAKAHASHI, Y.; SHIMIZU, N.; GOJOBORI, T.; GOLDE, D.W.; CHEN, I.S., 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**, v.82, p. 3101 – 3105, 1985.

SODRE, H.R.S.; MATOS, S.B.; SANTOS, A.L.; JESUS, R.; LIMA, F.W.M. Soroepidemiologia da infecção por HTLV-I/II em população assistida pelo Programa Saúde da Família em Salvador, Bahia. **J Bras Pat Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 369-374, 2010.

SONG, K.J.; NERURKAR, V.R.; PEREIRA-CORTEZ, A.J.; YAMAMOTO, M.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I., et al. Sequence and phylogenetic analyses of human T cell lymphotropic virus type I from a Brazilian woman with adult T cell leukemia: comparison with virus strains from South America and the Caribbean basin. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 1, p. 101-108, 1995.

SOUZA, V.G.; MARTINS, M.L.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; JANUÁRIO, J.N.; LADEIRA, R.V.P., SILVA, C.M.S., 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**, v. 45, n. 2, p.159–162, 2012.

SZCZYPINSKA, E.M.; WALLACE, M.R.; WAINSCOAT, B.; SALAS, C.M.; RICH, J.D. Human T-Cell Lymphotropic Viruses review. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/219285-overview#showall>>. Updated: Oct 05, 2015. Acesso: Outubro de 2017.

TAMEGÃO-LOPES, B.P.; REZENDE, P.R.; MARADEI-PEREIRA, L.M.C.; LEMOS, J.A.R. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 6, p. 548-552, 2006.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

VERDONCK, K.; GONZALEZ, E.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A.M.; VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet Infect Dis**, v. 7, p.266-281, 2007.

VIANA, G.M.C.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; OLIVEIRA, R.A.S.; SANTOS, A.C.; GALVÃO, C.S.; SILVA, M.A.C.N. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n.1, p. 50-53, 2014.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. **Cancer Control**, v. 14, n.2, p.133-140, 2007.

YASUNAGA, J.; SAKAI, T.; NOSAKA, K.; ETOH, K.; TAMIYA, S.; KOGA, S., et al. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. **Blood**, v. 97, p. 3177-3183, 2001.

YDY, R.R.; FERREIRA, D.; SOUTO, F.J.; FONTES, C.J. Prevalence of human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1/2) infection among puerperae in Cuiabá, Mato Grosso, 2006. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 1, p. 28–32, 2009.

WOLFE, N.D.; HENEINE, W.; CARR, J.K.; GARCIA, A.D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U., et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 7994-7999, 2005.

ZANELLA, L.; OTSUKI, K.; MARIN, M.A.; BENDET, I.; VICENTE, A.C. Complete genome sequence of Central Africa human T-cell lymphotropic virus subtype 1b. **J Virol**, v. 86, n. 22, p. 12451, 2012.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DO CEUMA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA
UNICEUMA RENASCENÇA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Detecção e diferenciação do Vírus Linfotrópico de células T Humanas por multiplex PCR em amostras de sangue de gestantes do Estado do Maranhão.

Você está sendo convidada a participar de um estudo de pesquisa que se destina detectar gestantes portadoras assintomáticas do vírus HTLV. Este estudo é importante porque poderá contribuir para o diagnóstico precoce da doença, bem como para orientá-la quanto ao aleitamento materno.

O estudo será feito da seguinte maneira: inicialmente você receberá todas as informações necessárias sobre os objetivos da pesquisa. Se você concordar em participar, serão coletados 15 mL de sangue. O DNA do proviral de células do seu sangue será extraído, amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase em multiplex (mPCR), depois o produto será sequenciado para identificação molecular do tipo de HTLV. Serão utilizados também os dados de respostas ao questionário (Apêndice A) que será aplicado no momento da coleta da amostra biológica.

Sempre que você desejar será fornecido esclarecimentos sobre o andamento dos experimentos para a publicação do estudo. A qualquer momento, você poderá recusar a continuar participando da pesquisa e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que para isto sofra qualquer penalidade ou prejuízo. Sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, identificá-la, será mantido em sigilo através de códigos. Ressalta-se que os resultados obtidos pela utilização de sua amostra clínica serão divulgados em forma de artigo em revista científica, nacional ou internacional. Você não será identificada de forma nenhuma na publicação deste relato de caso clínico. Ou seja, serão respeitados os princípios éticos e legais, de acordo com as recomendações da Resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde que norteia sobre a pesquisa envolvendo os seres humanos.

Os pesquisadores envolvidos neste estudo são: Drs. José de Ribamar Oliveira Lima e Maria Rosa Quaresma Bomfim, com os quais você poderá manter contato através dos telefones: 098-21091068 e 98-88811309, respectivamente.

Pesquisador Responsável	Pesquisador Responsável
Profª. Drª. Maria Rosa Quaresma Bomfim	Dr. José de Ribamar Oliveira Lima
CPF: 682.538.188-15	CPF: 179.252.153-72

São Luís, ____/____/____

Assinatura da paciente: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

APÊNDICE B – Questionário Estruturado

Questionário para a coleta de informações necessárias ao projeto de pesquisa intitulado: Detecção e diferenciação do Vírus Linfotrópico de células T Humanas por multiplex PCR em amostras de sangue de gestantes do Estado do Maranhão.

I- IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Registro: _____

Endereço:

Idade: _____ Data: ____/____/____

Entrevistador: _____

II- DADOS GERAIS

1. Município de residência: _____

2. Etnia

() Branco-1 () Negro-2 () Pardo-3 () Amarelo-4

3. Estado civil

() Solteira-1 () Casada/União estável-2 () Divorciada/separada-3 () Viúva-4

4. Idade da primeira menstruação:

() Anos de idade

5. Idade do início da vida sexual:

() Anos de idade

6. Tem parceiro sexual fixo?

() Não-0 () Sim-1

7. Em caso de não ter parceiro fixo, quantos parceiros você tem (ou teve) num espaço de tempo de um mês a um ano?

() Número de parceiros

8. Qual a frequência do uso do preservativo?

() Nunca usa-0 () Usa as vezes-1 () Usa sempre-2

9. Tem ou teve algum relacionamento sexual com parceiros usuários de drogas injetáveis?

() Não-0 () Sim-1

10. Quantas vezes já engravidou incluindo abortos?

() Primeira gestação-0 () Menos que 3 vezes-1 () Três vezes ou mais-2

11. Em caso de gestação prévia, qual o período de duração do aleitamento?

() Número de meses

12. Já recebeu alguma transfusão sanguínea?

() Não-0 () Sim-1

III- PERFIL SOCIAL

1. Grau de escolaridade

() Analfabeta-0 () Segundo grau incompleto-4

() Sem escolaridade/alfabetizada-1 () Segundo grau completo-5

() Primeiro grau incompleto-2 () Terceiro grau incompleto-6

() Primeiro grau completo-3 () Terceiro grau completo-7

2. Ocupação

() Desempregada-0 () Aposentada/pensionista-2

() Ativa-1 () Trabalha em casa (sem remuneração)-3

3. Quantos membros moram em sua residência?

() Sozinha-0 () 4 a 6 pessoas-2

() 1 a 3 pessoas-1 () 7 pessoas ou mais-3

4. Qual é aproximadamente a renda mensal familiar (em reais)?

() < que 1 salário mínimo-0

() 1 a 3 salários mínimos-1

() 4 a 5 salários mínimos-2

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção e diferenciação do vírus Introtópico de células T humanas por multiplex PCR em amostras de sangue de gestantes do Estado do Maranhão.

Pesquisador: MARIA ROSA QUARESMA BOMFIM

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 17080413.0.0000.5084

Instituição Proponente: Centro Universitário do Maranhão - UNICEUMA

Patrocinador Principal: Centro Universitário do Maranhão - UNICEUMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 372.289

Data da Relatoria: 27/05/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo será feito da seguinte maneira: inicialmente os pesquisadores fornecerão todas as informações necessárias sobre os objetivos da pesquisa

as gestantes. Se a paciente concordar em participar, ela assinará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a assinatura do TCLE serão

coletados 15 mL de sangue. O DNA do províral das células mononucleares periféricas será extraído, amplificado por Reação em Cadeia da

Polimerase em multiplex (mPCR), depois o produto será sequenciado para identificação molecular do tipo de HTLV infectante

Objetivo da Pesquisa:

Demonstrar por métodos sorológicos e moleculares a prevalência de infecções pelo HTLV em gestantes do Estado do Maranhão, compreendidas

nas faixas etárias de 15 a 45 anos de idade, atendidas no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Maranhão (LACEN-MA)

Endereço: DOS CASTANHEIROS

Bairro: JARDIM RENASCENÇA

CEP: 65.075-120

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)3214-4205

Fax: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DO
MARANHÃO - UNICEUMA**



Contribuição do Parecer: 372.289

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os pesquisadores envolvidos neste projeto estão sujeitos a riscos mínimos, que poderão ser totalmente eliminados pela utilização de equipamentos

de proteção individual (EPI's) tais como: luvas, máscara, fono, jaleco e óculos.

Benefícios:

As infecções por HTLV apresentam características peculiares como a presença de agrupamentos de genótipos em determinadas áreas geográficas,

aumento de prevalência com a idade e uma ocorrência mais elevada em mulheres. Neste aspecto, o conhecimento dos tipos circulantes em

mulheres gestantes do Estado do Maranhão, poderá ajudar na orientação destas gestantes quanto ao não aleitamento de seus filhos, uma vez que

uma das mais importantes formas de transmissão dos HTLV's ocorre da mãe para o filho durante o período de amamentação.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem relevância pois pretende determinar a prevalência de infecções pelo HTLV em gestantes do Estado do Maranhão. Apresenta os itens exigidos e de acordo como Introdução, Hipótese, Objetivos, metodologia, análise de dados, riscos e benefícios, orçamento, cronograma, referências

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem Pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais e critério do CEP:

Endereço: DCS CASTANHEIRAS

Bairro: JARDIM RENASCENÇA

CEP: 65.075-120

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)3214-4289

Fax: (98)3214-4212

E-mail: cep@ceuma.br

ANEXO B - Normas da Revista

Brazilian Journal of Microbiology

Instructions for Authors

TYPES OF ARTICLES

The **Brazilian Journal of Microbiology** accepts submissions of the following article types:

Research Papers:

report results of original research, which has not been published elsewhere.

Short communications:

a short communication is new and significant findings. Submit form is the same way as research paper. They receive the same review, they are not published more rapidly than research paper.

Reviews:

Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Authors are requested to contact the Editor-in-Chief (bjm.chief@gmail.com) before submission.

Letters to the editor:

letters to the editor are intended only for comments on final, typeset articles published in the journal (manuscripts posted online are not accepted) and must cite published references to support the writer's argument.

Your manuscript must be written clearly, in comprehensible, and linguistically correct English. Manuscripts written in poor English will not be accepted. Please check the section "English Language Support" how to get assistance.

Sections

The **Brazilian Journal of Microbiology** has the following sections (one them should be selected during the electronic submission process):

* Biotechnology and Industrial Microbiology

Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by bacteria. Biosynthesis and bioconversion of natural products, including antibiotics, xenobiotics, and macromolecules produced by fungi. Molecular aspects of fungal biotechnology. Molecular aspects of bacterial biotechnology.

* Food Microbiology

Applications of microorganisms (bacteria and fungi) for food production. Food borne diseases, food spoilage, and microbial ecology in foods.

* Bacterial and Fungal Pathogenesis

The genetic, biochemical, and structural basis of bacterial pathogenesis.

* Clinical Microbiology

Studies of medically-important bacteria, fungi and virus.

* Environmental Microbiology

Ecology of natural microbial assemblages, microbial diversity of natural environments such as water, soil, sediments and higher organisms. Microbial interactions. Biodegradation, Bioremediation, and Environmental considerations for genetically engineered microorganisms.

* Veterinary Microbiology

Diseases of animals, Control and/or treatment of animals, Animal pathogen diagnostics, and Veterinary or zoonotic pathogens

* Fungal and Bacterial Physiology

Biochemistry, biophysics, metabolism, cell structure, stress response, growth, differentiation and other related process.

* Bacterial, Fungal and Virus Molecular Biology

Fungal and bacterial genetics, molecular biology, gene regulation, DNA replication and repair, genomics, proteomics, transcriptomics.

* Education in Microbiology

Original research papers and reviews covering education and learning Technologies in Microbiology. Reporting experiences of learning methods with undergraduate or graduate students; effectiveness of pedagogical approaches; development and assessment of trends in education in microbiology.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out.

The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Plagiarism prevention with CrossCheck

Springer is a participant of CrossCheck, a multi-publisher plagiarism detection initiative to screen published and submitted content for originality. CrossCheck consists of two products: a database of scholarly publications (CrossCheck) and a web-based tool (iThenticate) to check an authored work against that database. This journal uses the plagiarism tool to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts and your manuscript may be screened upon submission for plagiarism against previously published works.

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed Data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper

EDITORIAL PROCEDURE

Single-blind peer review

This journal follows a single-blind reviewing procedure.

TITLE PAGE

The title page should include:

- * The name(s) of the author(s)
- * A concise and informative title
- * The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- * The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- * If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- * Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- * Use italics for emphasis.
- * Use the automatic page numbering function to number the pages.
- * Do not use field functions.
- * Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- * Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- * Use the equation editor or MathType for equations.
- * Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units). Genus and species names should be in italics. Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

*Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

* Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

* Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

* Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

* Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

* Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of intext citations and reference list.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

* All tables are to be numbered using Arabic numerals.

* Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

* For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

* Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

* Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

* Supply all figures electronically.

* Indicate what graphics program was used to create the artwork.

- * For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- * Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- * Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.
- * Definition: Black and white graphic with no shading.
- * Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- * All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- * Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- * Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- * To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- * Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- * Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- * Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- * Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- * Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- * Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- * No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- * Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- * Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s). Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

RESEARCH DATA POLICY

A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for noncommercial purposes, without breaching participant confidentiality. The journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

DataCite

Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory.

Persistent identifiers (such as DOIs and accession numbers) for relevant datasets must be provided in the paper

For the following types of data set, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory:

Mandatory deposition

Protein sequences

DNA and RNA sequences

DNA and RNA sequencing data

Genetic polymorphisms

Linked genotype and phenotype data

Macromolecular structure

Microarray data (must be MIAME compliant)

Crystallographic data for small molecules

Suitable repositories

Uniprot

Genbank

DNA DataBank of Japan (DDBJ)

EMBL Nucleotide Sequence Database (ENA)

NCBI Trace Archive

NCBI Sequence Read Archive (SRA)

dbSNP

dbVar

European Variation Archive (EVA)

dbGAP

The European Genome-phenome Archiv(EGA)

Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)

Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB)

Electron Microscopy Data Bank (EMDB)

Gene Expression Omnibus (GEO)
ArrayExpress

Cambridge Structural Database

Data availability

The journal encourages authors to provide a statement of Data availability in their article. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. Data availability statements can also indicate whether data are available on request from the authors and where no data are available, if appropriate.

Data Availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not

publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.

3. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

4. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

5. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available:

Data availability statements

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

- * The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- * The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').
- * A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').
- * Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.
- * Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.
- * No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim

copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate). Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person. Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others). Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions.

When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals. Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to a more accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- * Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- * Honoraria for speaking at symposia
- * Financial support for attending symposia
- * Financial support for educational programs
- * Employment or consultation
- * Support from a project sponsor
- * Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- * Multiple affiliations
- * Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- * Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- * Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/42770?print_view=true&detailsPage=pltc_i_3651923

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the name of the ethics committee that granted the exemption and the reasons for the exemption).

Authors must - in all situations as described above - include the name of the ethics committee and the reference number where appropriate.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee (include name of committee + reference number) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

Ethical approval retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists). Please provide the name of ethics committee and relevant permit number.

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.(include name of committee + permit number)”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

AUTHORSHIP PRINCIPLES

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,
Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or nonfinancial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards.

Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
 managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
 providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
 making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the end of the submission.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing – review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated.

Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peerreview process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

ENGLISH LANGUAGE SUPPORT

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review.

Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.