

Evaluación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa múltiplex anidada para la detección de HTLV-1

Evaluation of a nested multiplex polymerase chain reaction test for the detection of HTLV-1

Kevin Serrano-Segura^{1,a,e}, Eduardo Miranda-Ulloa^{1,b,f}, Soledad Romero-Ruiz^{1,a,g}, Fany Cárdenas-Bustamante^{1,c,h}, Hans Ramón Quiroz-Ruiz^{2,d,i}

Resumen

El Perú es un área endémica al virus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-1) y para su confirmación diagnóstica se usa pruebas serológicas que pueden dar resultados no concluyentes. **Objetivos:** evaluar una prueba de PCR múltiplex anidada para diagnosticar el HTLV-1. **Métodos:** la validación de la PCR se realizó con primers dirigidos a las regiones Pol y LTR del HTLV-1. Se empleó el gen β -globina como control endógeno interno y el límite de detección se evaluó con células MT2. Los parámetros de precisión diagnóstica se evaluaron frente a 95 muestras sanguíneas de Referencia. **Resultados:** la prueba evaluada obtuvo un límite de detección de 0,5 ng/ μ L de ADN; sensibilidad diagnóstica=97,1%, especificidad diagnóstica y analítica=100%, vpn=97,2%, vpp, repetibilidad y reproducibilidad=100%; Kappa, Índice Youden=0,97. **Conclusiones:** la prueba evaluada presenta un alto rendimiento diagnóstico y debido a su bajo costo se recomienda su implementación en el algoritmo del diagnóstico de HTLV-1 en Perú.

Palabras claves: diagnóstico, retrovirus, PCR anidado, virus linfotrópico T tipo 1 humano.

Abstract

Peru is an endemic area for human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and for its diagnostic confirmation serological tests are used, which can give inconclusive results. **Objectives:** to evaluate a nested multiplex PCR test to diagnose HTLV-1. **Methods:** PCR validation was performed with primers targeting the Pol and LTR regions of HTLV-1. The β -globin gene was used as an internal endogenous control and the detection limit was evaluated with MT2 cells. Diagnostic accuracy parameters were evaluated against 95 Reference blood samples. **Results:** the evaluated test obtained a detection limit of 0.5 ng/ μ L of DNA; diagnostic sensitivity=97.1%, diagnostic and analytical specificity=100%, vpn=97.2%, vpp, repeatability and reproducibility=100%; Kappa, Youden Index=0.97. **Conclusions:** the evaluated test has a high diagnostic performance and due to its low cost, its implementation in the HTLV-1 diagnosis algorithm in Peru is recommended.

Keywords: diagnosis, retrovirus, nested PCR, nested PCR nested PCR nested PCR.

El HTLV-1 está asociado mayoritariamente a la leucemia/linfoma de células T adultas y a la paraparesia espástica tropical. A nivel mundial se ha estimado que hay 10 millones de seres humanos infectados con HTLV-1 los cuales se encuentran distribuidos heterogéneamente, presentándose un estado de endemidad en Sudamérica, principalmente en Brasil, Perú, Chile y Colombia¹.

En Perú la detección de esta infección busca identificar anticuerpos anti-HTLV en suero o plasma mediante ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA)^{2,3}, quimioluminiscencia (CLIA) o electroquimioluminiscencia (ECLIA)⁴, aquellas muestras con resultados reactivos, indeterminados o discordantes, se confirman con inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁵, inmunoblot (IB)⁶ y/o Western blot (WB)⁷. IFI HTLV-1 es económica, pero sólo

resuelve hasta un 90% de los casos analizados, observándose resultados inespecíficos e indeterminados^{3,5}. Las pruebas de IB/WB arrojan entre 5 a 10% de resultados no concluyentes además su alto costo es la principal limitante para su uso⁶⁻⁷.

Las pruebas moleculares son utilizadas para resolver los casos no concluyentes a las pruebas serológicas confirmatorias; la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presentó buena eficiencia diagnóstica en distintos laboratorios de otros países endémicos⁸⁻¹¹.

Otra ventaja a destacar de la PCR frente a las pruebas serológicas es que pueden ser útiles en el diagnóstico del HTLV-1 en recién nacidos ya que, al encontrarse anticuerpos de madres infectadas en los recién nacidos o lactantes, las pruebas serológicas pueden dar falsos positivos¹².

A nivel mundial no se dispone de kits comerciables de técnicas moleculares para el diagnóstico cualitativo y cuantitativo de HTLV-1, de allí que cada país desarrolla y estandariza su propia prueba in house⁸⁻¹¹, resultando bastante económica en comparación con los IB/WB comerciales^{6,7}.

Brasil y Chile tienen un algoritmo o flujograma normativo que incluye las pruebas moleculares en el diagnóstico del paciente con HTLV-1^{9,13-14}, sin embargo, Perú no lo tiene, tal es así que, conociendo esa necesidad, se planteó el

¹Laboratorio de Referencia Nacional Virus de Transmisión Sexual, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

²Universidad Privada del Norte. Cajamarca, Perú. ^aMicrobiólogo, ^bBiólogo, magíster en Microbiología, ^cBióloga. ^dMicrobiólogo, maestro en Salud Pública.

^ehttps://orcid.org/0000-0002-6770-5975. ^fhttps://orcid.org/0000-0001-5687-5437

^ghttps://orcid.org/0000-0001-5687-5437. ^hhttps://orcid.org/0000-0002-4541-275X

ⁱhttps://orcid.org/0000-0002-8482-8328

*Correspondencia a: Eduardo Miranda-Ulloa

Correo electrónico:fernandoul@hotmail.com

Recibido el 13 de junio de 2023. Aceptado 28 de septiembre de 2023.

siguiente objetivo: estandarizar y evaluar una prueba de PCR múltiplex anidada in house de bajo costo para el diagnóstico de HTLV-1.

Materiales y métodos

La investigación observacional prospectiva de evaluación diagnóstica se desarrolló entre los años 2018 y 2019 en el Instituto Nacional de Salud (INS) de Perú.

Muestras empleadas.

Todas las muestras sanguíneas fueron seleccionadas de manera no probabilística y por conveniencia, las cuales procedieron del Laboratorio de Referencia Nacional Virus de Transmisión Sexual (LRN VTS) del INS. De la hemoteca se seleccionó un total de 95 muestras sanguíneas obtenidas en tubos con anticoagulante EDTA de las cuales 35 fueron positivos al virus HTLV-1, 35 negativos a los virus HTLV 1 y 2 procedente de personas aparentemente sanas y 25 muestras interferentes: Negativas a HTLV 1/2 y positivas a VIH¹⁰, Sífilis¹⁰ y VHB⁵ (Figura 1). Para estas 95 muestras, la prueba Gold Estándar fue el IB comercial (Fujirebio) que destaca un 100% de sensibilidad y un 99% de especificidad⁶. Adicionalmente se usó como controles de Referencia: linfocitos infectados con el virus HTLV-1 (línea celular MT2) y macrófagos sin infectar (línea celular K562)⁵.

Extracción de ADN

Se utilizó el kit comercial GeneJET™ Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific Inc). La cuantificación de ADN se determinó con el Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) y fueron conservados en -20 °C hasta su utilización.

Estandarización

Se utilizó agua grado biología molecular (Applichem), MgCl₂ y buffer de reacción de PCR NovaTaq Hot Star Buffer

(Merck Millipore); dNTPs Mix (Invitrogen) y la enzima NovaTaq Hot Start ADN Polymerase (Merck Millipore). Evaluamos distintas concentraciones de MgCl₂, primers, dNTPs y Taq polimerasa. Se usó como material de referencia ADN (20 ng/μL) de células MT2 infectadas con HTLV-1; se utilizaron primers dirigidos a la región LTR y Pol del genoma de HTLV-1, también se usó primers para el gen de la β-globina como control interno endógeno. Para la reacción final se consideró 25 μL de volumen usando un termociclador Biometra TOne (Analytik Jena); la desnaturalización fue hecha a 95°C por siete minutos, seguida de 35 ciclos (94°C por un minuto, 55 por un minuto, 72°C por dos minutos) una extensión final de 72°C por siete minutos y 4°C indefinido. Las condiciones de la PCR respecto a concentraciones y temperaturas fueron las mismas para ambas rondas, exceptuando que en la segunda ronda se emplearon distintos primers más dos μL del producto amplificado de la ronda inicial (Tabla 1).

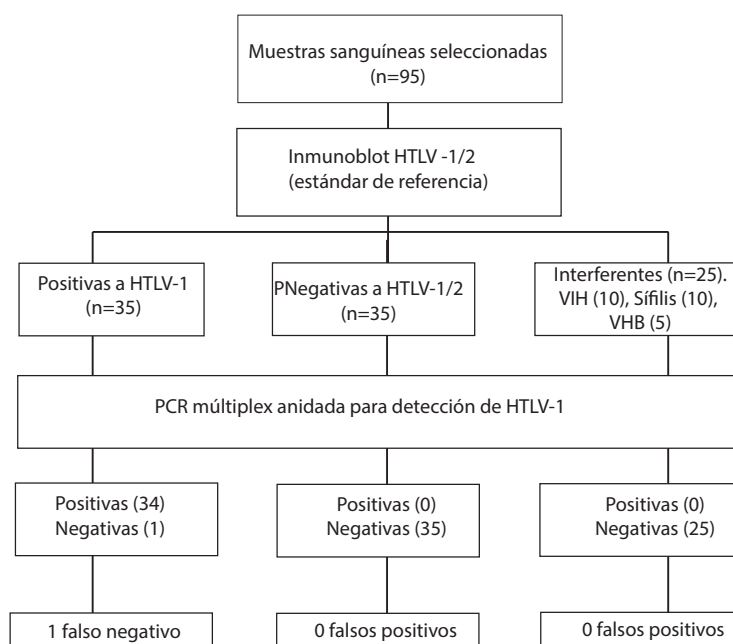
La corrida electroforética se realizó al 2,0% de agarosa usando un peso molecular de 100 pb como marcador de la marca Thermo Scientific. Se visualizaron las bandas usando el fotodocumentador ChemiDoc XRS de Biorad. El criterio de positividad, se definió de la siguiente manera: una muestra fue considerada como positiva si se evidenció la presencia del amplicon de 136 pb o del amplicon de 527 pb, o si hubo la presencia de ambos amplicones; además una muestra fue considerada negativa si no se evidenció la presencia de ninguno de los amplicones de 136 pb o de 527 pb.

Validación del ensayo

Para evaluar el límite de detección se analizaron diluciones seriadas del ADN proviral desde 50 a 0,001 ng/μL extraído del material de referencia (células MT2 infectadas). El límite de detección considerado fue la mínima concentración en la cual se visualizó los amplicones esperados. Se calculó los parámetros de precisión diagnóstica. La repetibilidad y

Tabla 1. Primers usados en la evaluación y estandarización de la PCR múltiplex anidada para el diagnóstico de HTLV-1

Gen-virus o Región	Primers	Secuencia 5'-3'	Amplicón esperado (pb)
Primera ronda			
<i>pol</i> HTLV-1	SK110	CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G	186
	SK111	GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT	
LTR	8200LA	CTC ACA CGG CCT CAT ACA GTA CTC	562
	R3Vext	CGC AGT TCA GGA GGC ACC RM	
Segunda ronda			
<i>pol</i> HTLV-1	POL 1.1	TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC	136
	POL 3.1	TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG	
LTR	8200LA	CTC ACA CGG CCT CAT ACA GTA CTC	527
	R3Vint	GAA CGC RAC TCA ACC GGC RYG GAT GG	
Control endógeno interno			
β-globina	HU β3	CGG CTG TCA TCA CTT AGA CCT C	150
	HU β4	CTT CAT CCA CGT TCA CTT TGC	



Fuente: bases de datos de la investigación

Figura 1. Diagrama de flujo de muestras incorporadas al estudio

reproducibilidad se evaluaron con tres concentraciones del material de referencia: frente al límite de detección y frente al 20% mayor y 20% menor al límite de detección; bajo las condiciones estandarizadas se realizaron cinco repeticiones para cada una de las tres concentraciones en tres días diferentes (15 repeticiones por cada concentración), con un analista distinto por día.

Análisis de datos

El análisis de datos y los cálculos de la precisión y rendimiento diagnóstico se hizo con el software Epidat 3.1 considerándose un intervalo de confianza al 95%.

Aspectos éticos

El presente estudio tuvo la aprobación del Comité de Ética

Tabla 2. Parámetros de rendimiento diagnóstico de la PCR múltiplex anidada para diagnóstico de HTLV-1, considerando al IB como estándar de referencia.

Parámetro	Evaluación (n=70)	
	Valor	IC 95%
Sensibilidad diagnóstica (%)	97,14	90,19-100,00
Especificidad diagnóstica (%)	100,00	98,57-100,00
Índice de validez (%)	98,57	95,08-100,00
Valor predictivo positivo (%)	100,00	98,53-100,00
Valor predictivo negativo (%)	97,22	90,47-100,00
Índice de Youden	0,97	0,92-1,03
Coeeficiente Kappa	0,97	0,92-1,00

Fuente: bases de datos de la investigación

en Investigación del INS de Perú siendo el código del proyecto OT-0010-18.

Resultados

La PCR se estandarizó en los siguientes parámetros: desnaturalización a 95°C, hibridación a 55°C, elongación a 72°C, 35 ciclos de amplificación. Las concentraciones óptimas por reacción fueron: MgCl₂ 4,0 mM; 0,5 U/μL de Taq polimerasa; 0,2 pmol/μL para Primers de Pol y 0,4 pmol/μL a LTR; 0,2 Mm para dNTPs. El límite de detección de ADN proviral extraído del material referencial (MT2) fue de 0,5 ng/uL. Asimismo, en todas las muestras sanguíneas sometidas a extracción de ADN se mostró amplificación del control endógeno interno.

Del total de muestras sanguíneas incorporadas al estudio y evaluadas mediante la PCR múltiplex anidada in house para detección de HTLV-1, no resultó ningún falso positivo y sólo se obtuvo un falso negativo (Figura 1).

Los resultados de los parámetros de rendimiento diagnóstico se muestran en la Tabla 2, además, se obtuvo un 100% de especificidad analítica, no encontrándose reactividad cruzada frente a las 25 muestras de tres agentes infecciosos distintos (Sífilis, VIH y VHB).

Otros hallazgos importantes a destacar fue que la repetibilidad y reproducibilidad para concentraciones de 0.4 ng/μL, 0.5 ng/μL, 0.6 ng/μL de ADN y la tasa de detección (intraensayo e interensayo) del material referencial para todas las repeticiones tuvo una concordancia del 100%.

La interpretación del perfil electroforético de la PCR múltiplex anidada HTLV-1 se destaca en la Figura 2.

Discusión

El flujograma de diagnóstico de HTLV-1 implica la

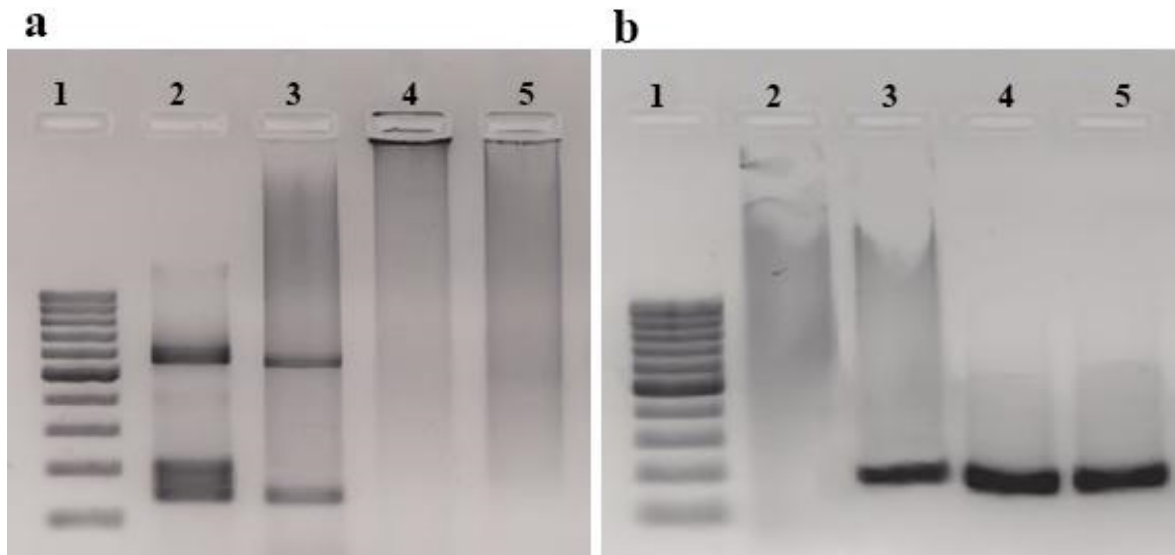


Figura 2. Electroforesis de la PCR múltiplex anidada para el diagnóstico de HTLV-1. a) Amplicones de 527 pb para LTR y 136 pb para pol HTLV-1. Carril 1: marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: control positivo MT2. Carril 3: control positivo muestra. Carril 4: control negativo K562. Carril 5: control negativo muestra. b) Amplificación de control endógeno β -globina de 150 pb. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 2: control blanco. Carril 3: control positivo MT2. Carril 4,5: muestras

realización de técnicas de diagnóstico serológico (ELISA, CLIA, ECLIA, IFI, IB o WB) no obstante estas metodologías producen una proporción considerable de resultados no concluyentes¹⁰, esto implica todo un desafío en países endémicos y sin políticas claras para el manejo, prevención y control de las infecciones por HTLV¹⁵, razón por lo cual se ha propuesto el uso de PCR debido a que son menos costosas en comparación de IB o WB^{2,9}. En el presente estudio se estandarizó y evaluó una PCR múltiplex anidada, teniendo como target diagnósticos genes pol y LTR del genoma proviral de los cuales son unas de las regiones más utilizadas para detección de ADN proviral de HTLV-1¹⁰, otros ensayos emplean como genes confirmatorios env, tax, LTR para PCR anidada y pol para PCR cuantitativa¹¹.

En el presente ensayo se determinó como límite de detección 0,5 ng/ μ L de ADN proviral usando la línea celular MT2 para genes pol y LTR, este límite es óptimo comparado con otra estandarización realizada en Brasil frente a pol y tax pero usando la línea celular C91-PL con un límite de detección 100 ng/ μ L para PCR convencional y 10 ng/ μ L para RT-PCR; si se utilizaba la línea celular BBF el límite fue de 1 ng/ μ L tanto en PCR convencional y RT-PCR¹⁰, esto indica que el límite de detección puede estar influenciado por las líneas celulares y por el tipo de PCR validado.

Respecto a la sensibilidad y especificidad encontrada, los resultados son semejantes a los obtenidos por Gonçalves et al.,¹¹ quien reportó una sensibilidad del 97,4% y especificidad del 100% validando un múltiplex RT-PCR para HTLV-1, otras PCR también muestran resultados comparables a los de esta investigación¹⁰. Si bien es cierto se han validado PCR para confirmar simultáneamente HTLV-1/2 estas

presentan sensibilidad baja (94,6 % para HTLV-1 y 78,6 % para HTLV-2) comparados con nuestro estudio¹⁶. Otros parámetros de validación que obtuvieron el 100% fueron repetibilidad, reproducibilidad y vpp. Si bien es cierto que de las 35 muestras positivas testeadas solo 34 fueron positivas por PCR (vpp=97,2), es probable que este único resultado negativo por PCR se explique por la baja carga proviral¹⁷ presente en la muestra. Asimismo, el coeficiente kappa y el índice de Youden muestran que esta PCR tiene una fuerza de concordancia casi perfecta comparada al IB y un buen rendimiento como prueba diagnóstica.

Es muy importante mencionar que en este estudio se optó por una PCR múltiplex anidada puesto que, esta metodología comparada a otros tipos de PCR, incrementa tanto la sensibilidad como la especificidad para detectar HTLV-1, ya que en la segunda ronda se vuelve a amplificar el producto de la primera reacción, mientras que los cebadores internos sólo amplifican si en la primera reacción se logró obtener un producto específico¹⁸.

Haciendo una estimación preliminar, la presente prueba molecular confirmatoria para la detección de HTLV-1 costaría 21 dólares por ensayo, siendo prácticamente sólo el doble del costo de la prueba in house IFI-HTLV-1 (10,7 dólares por ensayo)⁵, pero 3,2 veces menor que IB comercial (67 dólares para cada ensayo)⁶ y 5,4 veces menor que el Western blot comercial (113 dólares por ensayo)⁷. En consecuencia, esta PCR validada se presenta como una buena opción para Perú, siendo que el diagnóstico molecular de esta enfermedad es más económico especialmente en países endémicos¹⁹.

Respecto a las limitaciones del ensayo, éste no cuantifica carga proviral, además al igual que Costa et al.,⁹ consideramos

que, si bien esta metodología puede detectar al virus en muestras con resultados no concluyentes, este tipo de ensayos no eliminan la necesidad de las pruebas serológicas confirmatorias, sino más bien son ensayos complementarios. Otra limitación se encuentra en el número no tan robusto de muestras evaluadas, pues fue difícil la disponibilidad de muestras frescas sanguíneas estudiadas. Una última limitación fue que solo se evaluó la prueba para identificación de HTLV-1 y no para HTLV-2, sin embargo, debemos destacar que la proporción de la distribución geográfica de estos virus en Perú es de 98% y 2% respectivamente²⁰.

Finalmente, se concluye que la prueba PCR múltiple anidada HTLV-1, es una buena alternativa para el diagnóstico

fiable de este virus en muestras sanguíneas, presentando un alto rendimiento diagnóstico y debido a su bajo costo se recomienda su implementación en el flujograma del diagnóstico de HTLV-1 en Perú.

Conflictos de interés: Todos los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

Agradecimientos: A la bióloga Manuela Luján Velásquez de la Universidad Nacional de Trujillo y a la Bióloga Susan Espetia Anco del Instituto Nacional de Salud por sus aportes significativos en la presente investigación.

Referencias bibliográficas

- World Health Organization. Human T-lymphotropic virus type 1: technical report. 2020. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/339773/9789240020221-eng.pdf?sequence=1> [citado el 19 de mayo de 2023]
- Tasayco-Magallanes E, Miranda-Ulloa E, Romero-Ruiz S, Cárdenas-Bustamante F, Briceño-Espinoza R, Yana-Calatayud B. Evaluación de dos marcas comerciales de pruebas de ELISA para el diagnóstico de HTLV-1 frente a muestras peruanas. *Rev Chilena Infectol.* 2020;37(6):780-783. Disponible en: <https://www.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/660/566>
- Instituto Nacional de Salud (INS). Anuario Estadístico 2021. Lima, Perú: Ministerio de Salud, INS. 2021. Disponible en: <https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/20.500.14196/1499/ANUARIO%20ESTADISTICO%202021.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [citado el 19 de mayo de 2023]
- Salinas K. Seroprevalencia de HTLV 1 y 2 y características epidemiológicas de donantes de sangre seropositivos de un hospital público de Lima - Perú en el año 2018. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/11852/Salinas_vk.pdf?sequence=1&isAllowed=y [citado el 19 de mayo de 2023]
- Romero-Ruiz S, Miranda-Ulloa E, Briceño-Espinoza R. Rendimiento diagnóstico de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra HTLV-1. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2017; 34 (3): 459-465. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342017000300012&script=sci_abstract
- INNO-LIA™. Fujirebio Technologiepark. Belgium.2020. Disponible en: <https://www.fujirebio.com/en/products-solutions/innolia-htlv-iii-score>
- Bioblot. Product improvement. Barcelona, España: BOKIT.2013. Disponible en: <https://studylib.es/doc/8827155/bioblot-htlv-i-y-ii>
- Kuramitsu M, Okuma K, Tezuka K, Nakamura H, Sagara Y, Kurane I, et al. Development and evaluation of human T-cell leukemia virus-1 and -2 multiplex quantitative PCR. *Microbiol Immunol.* 2019;63(11):458-464. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12740>
- Costa EA, Magri MC, Caterino-de-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods.* 2011;173(2):280-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.018>
- Ji H, Chang L, Yan Y, Wang L. Development and validation of a duplex real-time PCR for the rapid detection and quantitation of HTLV-1. *Virol J.* 2023;20(9). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01970-y>
- Gonçalves MG, Fukasawa LO, Rodriguez K, Takenori F, Caterino-de-Araujo A. Development and Validation of Multiplex Quantitative Real-Time PCR Assays for Simultaneous Detection and Differentiation of HTLV-1 and HTLV-2, Using Different PCR Platforms and Reagent Brands. *Front Microbiol.* 2022;13:831594. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831594>
- Rosadas C, Taylor GP. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet Research Needs. *Front Microbiol.* 2019;10:999. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00999>
- Guía de Manejo Clínico del Paciente con HTLV. Ministério da Salud. 2004. Disponible en: https://bvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_manejo_clinico_do_paciente_com_HTLV.pdf [citado el 19 de mayo de 2023].
- Protocolo de atención de pacientes con HTLV-I. 2a versión. Ministerio de Salud. Chile-2018. 2018 Disponible en: <https://diprece.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/10/PROTOCOLO-HTLV-definitiva-2da-versi%C3%B3n.pdf> [citado el 19 de mayo de 2023].
- Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, et al. Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? *Viruses.* 2015;7:5643-58. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v7112897>
- Rocha-Junior MC, Strazza E, Nanev S, Assone T, Pedreschi M, Lima G, et al. Rapid and Sensitive Qualitative Duoplex Real-Time PCR Method for Discriminatory and Confirmatory Diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 Infections: Brazilian Multicentric Study. *Front Med.* 2022;9:881630. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.881630>
- Campos KR, Gonçalves MG, Caterino-de-Araujo A. Short Communication: Failures in Detecting HTLV-1 and HTLV-2 in Patients Infected with HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2017;33(4):382-385. Disponible en: <https://doi.org/10.1089/aid.2016.0191>
- Benedetto EJ, Molgó NM, González B S. Detection of HTLV-1 DNA in biopsies of Chilean patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Rev Med Chil.* 2014;142(3):314-22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872014000300005>
- Ruggieri M, Berini C, Ducasa N, Malkovsky M, Fisch P, Biglione M. Molecular detection of human T-lymphotropic virus type 1 infection among oncology patients in Germany: A retrospective view. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217560. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0217560>
- Miranda-Ulloa E, Romero-Ruiz S, Montalvo Otivo R, Suárez-Agüero D, Quiroz-Ruiz HR, Valverde-Ticlia F, et al. Distribución geográfica y tipo de infección del virus linfotrópico T humano (HTLV) en pacientes peruanos 2019 - 2021. *Rev Chilena Infectol.* 2023;40(2). Disponible en: <https://revinf.cl/index.php/revinf/article/view/1678>