

Validação de Amostras Coletadas no Sistema de Citologia Líquida CellPreserv® (Kolplast) para Detecção de *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Herpes Virus Tipo I*, *Herpes Virus Tipo II* e *Trichomonas vaginalis* por Biologia Molecular

O objetivo desta validação é verificar se o coletor CellPreserv possui algum componente que iniba ou altere o resultado previamente positivo de espécimes cérvico-vaginais coletados neste meio de preservação quando submetidos à uma reação de PCR em tempo real específica para os patógenos *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Herpes Virus Tipo I*, *Herpes Virus Tipo II* e *Trichomonas vaginalis*.

A validação de amostras coletadas no coletor CellPreserv para detecção destes patógenos utilizou um pool de 4 espécimes cérvico-vaginais positivos para todos os alvos testados, 4 amostras de DNA sintético positivo para todos os alvos testados e 2 amostras negativas para todos os alvos testados que foram processados pelos kits *Microbial DNA qPCR Assays (QIAGEN)*.

Protocolo de Processamento de Amostras de Células Cérvico-Vaginais Coletadas em Coletor CellPreserv por Microbial DNA qPCR Assays (QIAGEN).

- Misturar os volumes totais de 4 espécimes cérvico-vaginais que tenham resultado previamente positivos para todos os alvos analisados e centrifugar em centrífuga com rotor horizontal a $800g \pm 15g$ por 15 ± 1 minuto.
- Misturar os volumes totais de 2 espécimes cérvico-vaginais que tenham resultado previamente negativos para todos os alvos analisados e centrifugar em centrífuga com rotor horizontal a $800g \pm 15g$ por 15 ± 1 minuto. Remover os tubos da centrífuga e descartar o sobrenadante com cuidado para não desprezar o pellet. Bater o tubo 3 vezes em papel absorvente para remover o excesso de líquido.
- Ressuspender o precipitado de cada pool (positivo e negativo) em 2 frascos de CellPreserv e alíquotar quatro replicatas de 5 ml para cada frasco.
- Extrair cada replicata de 5 ml utilizando o extrator automatizado QIAcube (QIAGEN) no protocolo QIAamp DNA Mini Kit, volume de eluição de 50 ul.

- Cada replicata originou 6 ensaios para cada alvo testado.
- A reação de PCR em tempo real do kit Microbial DNA qPCR Assay (QIAGEN) para cada alvo foi preparada de acordo com as instruções do fabricante ilustrada abaixo:

	Mix para 1 reação
Master Mix	12,5 ul
Primer/Probe Assay Específico	1 ul
Água para PCR	0
DNA	11,5 ul

Protocolo de Processamento de Amostras de DNA Sintético Coletadas no Coletor CellPreserv Microbial DNA qPCR Assays (QIAGEN).

- Foram preparados 4 amostras de DNA sintético positivo para todos os alvos analisados (20 ul de DNA sintético altamente concentrado + 1980 ul de meio CellPreserv).
- Cada amostra foi extraída utilizando o extrator automatizado QIAcube (QIAGEN) no protocolo QIAamp DNA Mini Kit, volume de eluição de 50 ul.
- Cada amostra originou 7 ensaios para cada alvo testado.
- A reação de PCR em tempo real do kit Microbial DNA qPCR Assay (QIAGEN) para cada alvo foi preparada de acordo com as instruções do fabricante ilustrada abaixo:

	Mix para 1 reação
Master Mix	12,5 ul
Primer/Probe Assay Específico	1 ul
Água para PCR	0
DNA	11,5 ul

Resultados da validação:

- Houve 100% de concordância entre os resultados originados para DNA sintético (3 replicatas), para pool positivo de esfregaços cérvico-vaginais (3 replicatas) e para pool negativo de esfregaços cérvico-vaginais (3 replicatas) para os patógenos *Mycoplasma hominis*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae* e *Herpes Simples Tipo 1*.
- No caso do alvo *Ureaplasma urealyticum* houve concordância para o DNA sintético e para o pool negativo de esfregaços cérvico-vaginais, mas não houve concordância no pool positivo de esfregaços cérvico-vaginais.
- No caso do alvo *Herpes simples 2* houve concordância para o pool negativo de esfregaços cérvico-vaginais e para o pool positivo de esfregaços cérvico-vaginais, mas não houve concordância para o DNA sintético.
- Para verificar se as discordâncias de *Ureaplasma urealyticum* e *Herpes simples 2* foram selecionadas 4 amostras cérvico-vaginais positivas para *Ureaplasma urealyticum* recebidas no mês corrente e foram preparadas 4 novas amostras de DNA sintético positivo apenas para *Herpes simples 2*. Estas novas amostras foram extraídas novamente e mais 3 ensaios para cada agente foram realizados. No caso de *Ureaplasma urealyticum* foi possível detectar o patógeno nesta nova extração. No caso de *Herpes simples 2*, ainda não foi possível detectar o DNA sintético nesta nova extração.
- No caso de *Trichomonas vaginalis* não houve concordância em nenhum dos tipos de amostras testados.

Conclusão da validação:

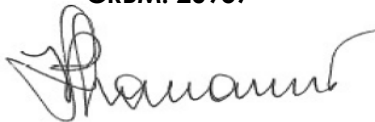
- O coletor CellPreserv foi validado para a detecção por PCR em tempo real utilizando os kits Microbial DNA qPCR Assays específicos para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Herpes Simples 1* e *Herpes simples 2*.
- Embora em um primeiro momento os ensaios de *Ureaplasma urealyticum* e *Herpes simples 2* tenham apresentado discordância para amostras cérvico-vaginais

positivas e DNA sintético, respectivamente, foi possível aprovar a detecção destes dois alvos pelas seguintes razões: 1) não é possível excluir a possibilidade de que a *Ureaplasma urealyticum* presente no primeiro grupo de amostras testadas tenha se degradado ao longo do tempo (as amostras foram coletadas há mais de um mês); 2) não é possível excluir a possibilidade de que houvesse algum tipo de inibidor do pool de amostras cérvico-vaginais positivas que atuou apenas no sistema de PCR em tempo real da *Ureaplasma urealyticum* (que não estava presente ou estava presente mais diluído quando foram testadas apenas amostras positivas para este alvo no segundo experimento); 3) existe a possibilidade de que o DNA sintético utilizado como controle para o *Herpes Simples Tipo 2* seja mais frágil e não suporte as diversas etapas de lise, aquecimento, lavagem e eluição da extração automatizada, o que inviabilizou a detecção do mesmo nos dois experimentos realizados. Entretanto, a detecção dos dois patógenos funcionou com amostras cérvico-vaginais, que mimetiza melhor o que ocorrerá no dia-a-dia, permitindo a validação dos mesmos para o coletor CellPreserv.

- O objetivo destes experimentos foi visualizar se o coletor CellPreserv possuía em sua composição algum componente que atuasse como inibidor das reações de PCR em tempo real utilizadas para detectar estes alvos específicos, impedindo portanto a sua utilização na coleta de amostras cérvico-vaginais para a detecção destes alvos. Este resultado não foi evidenciado pelos experimentos realizados.
- O coletor CellPreserv não foi validado, neste momento, para a detecção por PCR em tempo real utilizando o kits *Microbial DNA qPCR Assays* específico para *Trichomonas vaginalis*. Por ser um protozoário delicado, mais experimentos são necessários para definir as condições ideais para validar este coletor para este uso.

Patricia Thomann

CRBM: 20957



Fernanda Dahrouge Chiarot

CRBM: 10628

