

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

RAÍSSA DE MORAES PERLINGEIRO

IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL PARA
QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8/KSHV EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV

RIO DE JANEIRO

2021

RAÍSSA DE MORAES PERLINGEIRO

**IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL PARA
QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8/KSHV EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do título de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica, sob a orientação do Prof. Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva e da Profa. Dr.^a Juliana dos Santos Barbosa Netto

RIO DE JANEIRO

2021

(Ficha catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca Central de Manguinhos para a versão final da dissertação)

de Moraes Perlingeiro, Raíssa.

Implementação da técnica da PCR em tempo real para quantificação da carga viral do HHV-8/KSHV em pacientes infectados pelo HIV. / Raíssa de Moraes Perlingeiro. - Rio de Janeiro, 2021.

63 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, 2021.

Orientador: Gilberto Marcelo Sperandio da Silva.

Co-orientadora: Juliana dos Santos Barbosa Netto.

Bibliografia: f. 40-42

1. AIDS. 2. HIV. 3. Sarcoma de Kaposi. 4. KSHV. 5. HHV-8. I. Título.

RAÍSSA DE MORAES PERLINGEIRO

**IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL PARA
QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8/KSHV EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do título de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica.

Orientadores: Prof. Dr. Gilberto Marcelo Sperandio da Silva

Profa. Dra. Juliana dos Santos Barbosa Netto

Aprovada em: 28/05/2021

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Estevão Portela Nunes (Presidente)

Dr.^a Yasmine Rangel Vieira

Dr. Antonio Guilherme Fonseca Pacheco

Dr.^a Sandra Wagner Cardoso

“Um sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas um sonho que se sonha junto é realidade”
Raul Seixas

AGRADECIMENTOS

O primeiro ano do Mestrado Profissional foi um grande desafio por eu ter iniciado ainda no terceiro ano da Residência Médica. No segundo ano do mestrado, quando eu imaginei que teria mais tempo e tranquilidade para me dedicar à parte de bancada que meu tema me impunha, teve início a pandemia de COVID19 e eu tive que me dividir entre dois mundos inteiramente novos para mim: o laboratorial e o de Infectologista formada frente a uma das maiores pandemias que já assolaram a humanidade. Seria impossível terminar esse trabalho de forma satisfatória sem o apoio de tantas pessoas e a elas devo toda a minha gratidão.

Ao Diogo, meu companheiro, melhor amigo, minha fortaleza, meu porto seguro, quem está comigo em cada aventura e, na mais recente e mais linda de todas, na criação do nosso pequeno e amado Heitor.

Aos meus pais e irmãos que sempre acreditaram em mim, me apoiaram ao longo da minha formação, torceram por cada vitória e me ajudaram a me erguer em cada derrota.

Ao meu orientador, Gilberto, por ter acreditado nesse projeto e por toda sua disponibilidade durante o processo.

À Juliana, muito mais que coorientadora desse projeto, uma inspiração profissional para mim e a quem eu tenho a sorte de chamar de amiga. Ela é a mulher com mais fibra que já conheci e os últimos dois anos foram também de muitas vitórias pessoais para ela.

À Yasmine que possibilitou que esse trabalho saísse das encruzilhadas que foram acontecendo pelo caminho e que, com toda paciência, me apresentou ao mundo da bancada.

A todos os meus amigos de trabalho tanto da Fiocruz (Priscila, Anna Emília, Rachel, Ingrid, Rosalina) e do IEISS (Ana Luiza, Isabel, Sabrina, Débora, Clarisse e Rafael) que me ajudaram com escala e trocas de plantão, principalmente na reta final.

Perlingeiro, RM. **Implementação da técnica da PCR em tempo real para quantificação da carga viral do HHV-8/KSHV em pacientes infectados pelo HIV.** Rio de Janeiro, 2021. 65 f. Dissertação [Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

Introdução: O Sarcoma de Kaposi (SK) é a mais frequente neoplasia em pacientes vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) hoje, ainda que sua incidência tenha declinado desde a implementação da terapia antirretroviral (TARV), e continua sendo grande causa de morbimortalidade. O vírus denominado KSHV (*Kaposi Sarcoma HerpesVirus*) é o causador do SK e de outras doenças como a Doença Multicêntrica de Castleman e o linfoma de efusão primária, que podem ter apresentação clínica muito grave. A quantificação da carga viral do KSHV através do método da PCR (do inglês, *polimerase chain reaction*) pode ser usada no diagnóstico diferencial de doenças graves associadas a esse vírus. **Justificativa:** Sendo o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) um serviço de referência para o tratamento de SK e AIDS, a quantificação do KSHV pela técnica da PCR é muito importante para o diagnóstico diferencial nos pacientes graves, agilizando a tomada de conduta terapêutica. **Objetivo Geral:** Implementar a técnica da PCR em tempo real para quantificação da carga viral do KSHV, em plasma ou soro, de pacientes infectados pelo HIV e diagnóstico de Sarcoma de Kaposi, que apresentem formas clínicas graves, bem como para auxiliar no diagnóstico de outras doenças associadas ao KSHV. **Metodologia:** Amostras de material biológico (plasma EDTA e soro) coletadas de pacientes que iniciaram tratamento quimioterápico para SK no INI do ano de 2011 a 2013 foram processadas para realização da quantificação da carga viral do KSHV através de técnica de qPCR. **Resultados:** Não foi possível a implementação utilizando-se metodologia de curva padrão com curva sintética fita simples por não hibridização completa com o DNA viral, o que poderia comprometer o resultado do exame. Dessa forma, foi criada uma curva sintética fita dupla que ainda precisa de aperfeiçoamento para ser implementada. **Discussão:** Optamos por manter a utilização do plasmídeo para quantificação da carga viral do KSHV enquanto, em projeto futuro, melhoraremos a performance da curva sintética fita dupla para que sua utilização possa ser validada, visto que essa metodologia é mais reprodutível e menos laboriosa. **Conclusão:** A técnica de qPCR foi padronizada para os equipamentos disponíveis na Plataforma Multiusuário do INI. Além disso, foi elaborado fluxograma para orientação da coleta do material a ser examinado, incluindo suas indicações clínicas.

Palavras-Chave: AIDS, HIV, Sarcoma de Kaposi, KSHV, HHV-8, KICS.

Perlingeiro, RM. **Real-time PCR implementation for quantification of HHV-8/KSHV viral load in HIV-infected patients.** Rio de Janeiro, 2021. 65f. Dissertação [Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz.

ABSTRACT

Background: Kaposi's sarcoma (KS) is the most common neoplasm in patients living with the human immunodeficiency virus (HIV) today, although its incidence has declined since the implementation of antiretroviral therapy (ART) and remains a major cause of morbidity and mortality. The KSHV (Kaposi Sarcoma Herpes Virus) is the cause of KS and other serious diseases, such as Castleman's Multicentric Disease and Primary Effusion Lymphoma. The quantification of KSHV viral load using the PCR method (Polymerase Chain Reaction) can be used in the differential diagnosis of serious diseases associated with this virus. **Purpose:** As the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI) is a reference service for the treatment of KS and AIDS, the quantification of KSHV by the PCR method is important for the differential diagnosis in critically ill patients, accelerating the choice of the appropriate treatment. **Main goal:** To implement the real-time PCR method to quantify KSHV in serum or plasma of critically ill HIV-infected patients with a diagnosis of KS, as well as to assist in the diagnosis of other KSHV-associated diseases. **Methods:** EDTA plasma and serum samples collected from patients who started chemotherapy for KS at INI from 2011 to 2013 were processed to quantify HHV-8 using the qPCR method. **Results:** It was not possible to implement the technic creating a standard curve with a single curve synthetic oligonucleotide probably because of incomplete hybridization with viral DNA, which could compromise the test result. Thus, a double-stranded synthetic oligonucleotide was designed, but it still needs to be improved before its implementation. **Discussion:** The plasmid method will be used to quantify the HHV-8 viral load while, in a future project, we will improve the performance of the double-stranded synthetic oligonucleotide we designed, so that its use can be validated, since this methodology is more reproducible and less timing consuming. **Conclusion:** The qPCR technique was standardized for the equipment available on INI's Multi-User Platform. In addition, a flow chart for collection of specimen, including its clinical indications, was elaborated.

Key words: AIDS, HIV, Kaposi's Sarcoma, KSHV, HHV-8, KICS.

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 | BREVE HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA | 10 |
| 1.2 | ESTRUTURA VIRAL..... | 13 |
| 1.3 | APRESENTAÇÃO CLÍNICA | 14 |
| 1.4 | OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO KSHV | 17 |
| 1.5 | METODOLOGIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL..... | 19 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 22 |
| 3 | OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 23 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 24 |
| 4.1 | ESQUEMA EXPERIMENTAL E AMOSTRAS UTILIZADAS | 24 |
| 4.2 | BIOSSEGURANÇA..... | 26 |
| 4.3 | PREPARO DE REAGENTES DA PCR EM TEMPO REAL | 26 |
| 4.4 | PROCEDIMENTO DA PCR EM TEMPO REAL..... | 28 |
| 4.5 | ELABORAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO..... | 31 |
| 5 | RESULTADOS | 32 |
| 5.1 | CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO COM CURVA SINTÉTICA | 32 |
| 5.2 | CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO COM gBLOCK | 36 |
| 5.3 | COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE PLASMA EDTA E SORO UTILIZANDO O GBLOCK..... | 38 |
| 6 | DISCUSSÃO | 39 |
| 7 | CONCLUSÃO | 41 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 40 |

| | |
|--|----|
| APÊNDICE A – FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI..... | 43 |
| APÊNDICE B – EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO “ <i>HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID</i> ” DA ROCHE. | 50 |
| APÊNDICE C – REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. | 57 |

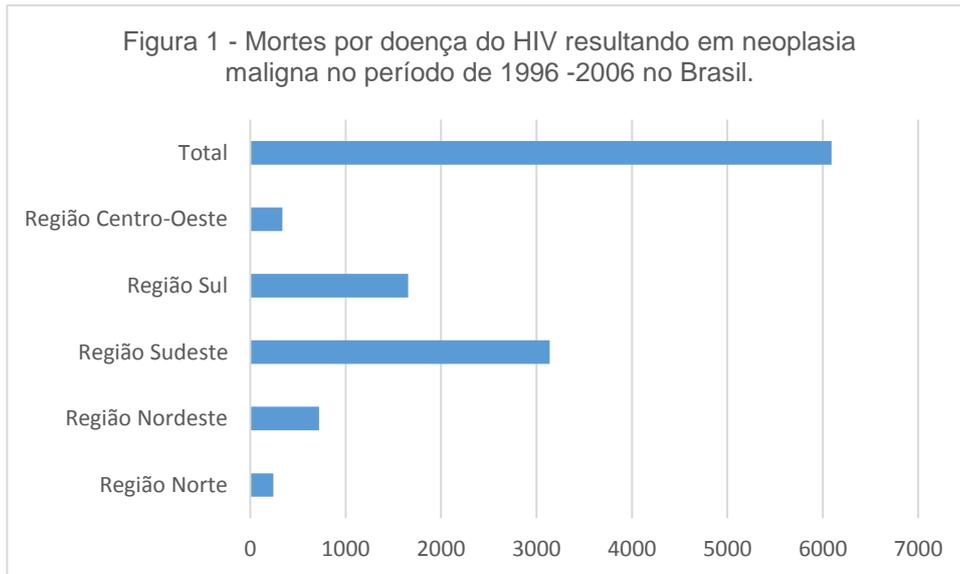
1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

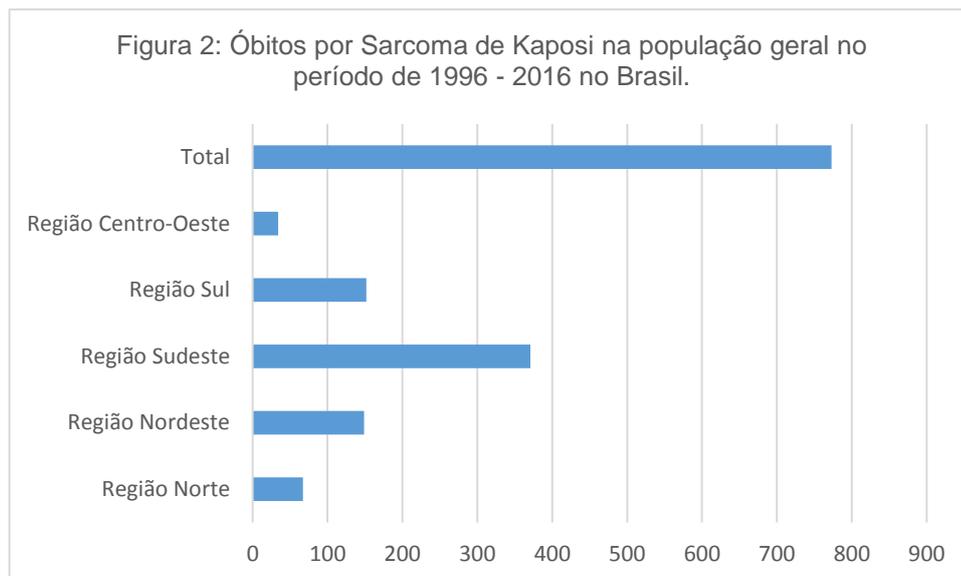
O Sarcoma de Kaposi (SK) foi descrito pela primeira vez em 1872 pelo dermatologista húngaro Dr. Moritz Kaposi como lesões múltiplas e pigmentadas na pele, de causa idiopática (KAPOSI, 1872). Apenas nos anos 80 foi sugerida a hipótese de uma causa infecciosa para essa neoplasia, principalmente pela observação do aumento da incidência de SK na população de homens que faziam sexo com homens, infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o que, inclusive, foi o gatilho para a descoberta da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) (FRIEDMAN-KIEN, 1981). Em 1994, foi comprovada a associação com o vírus herpes 8 (CHANG et al., 1994).

Embora a incidência de SK associado à AIDS tenha declinado desde a implementação da terapia antirretroviral combinada (ART) (SCHNEIDER; DITTMER, 2017), persiste como importante problema clínico, sendo responsável por grande morbimortalidade e até 50% dos pacientes nunca atinge remissão total (CHEUNG; PANTANOWITZ; DEZUBE, 2005; LETANG et al., 2010; NGUYEN et al., 2008). No Brasil, mesmo com o acesso universal à terapia antirretroviral desde 1997, o SK permanece como a neoplasia definidora de AIDS mais comum (CASTILHO et al., 2015).

Segundo o DATASUS, no período 1996-2016 ocorreram 6.092 mortes por doença do HIV resultando em neoplasia maligna (CID10: B21) no Brasil, sendo 3.137 na região Sudeste (Figura 1). Além disso, no mesmo período observaram-se 773 mortes por SK (CID10: C46) sendo, a maior parte (371) também no Sudeste (Figura 2).



Fonte: DATASUS acessado em 15/03/2021.



Fonte: DATASUS acessado em 15/03/2021.

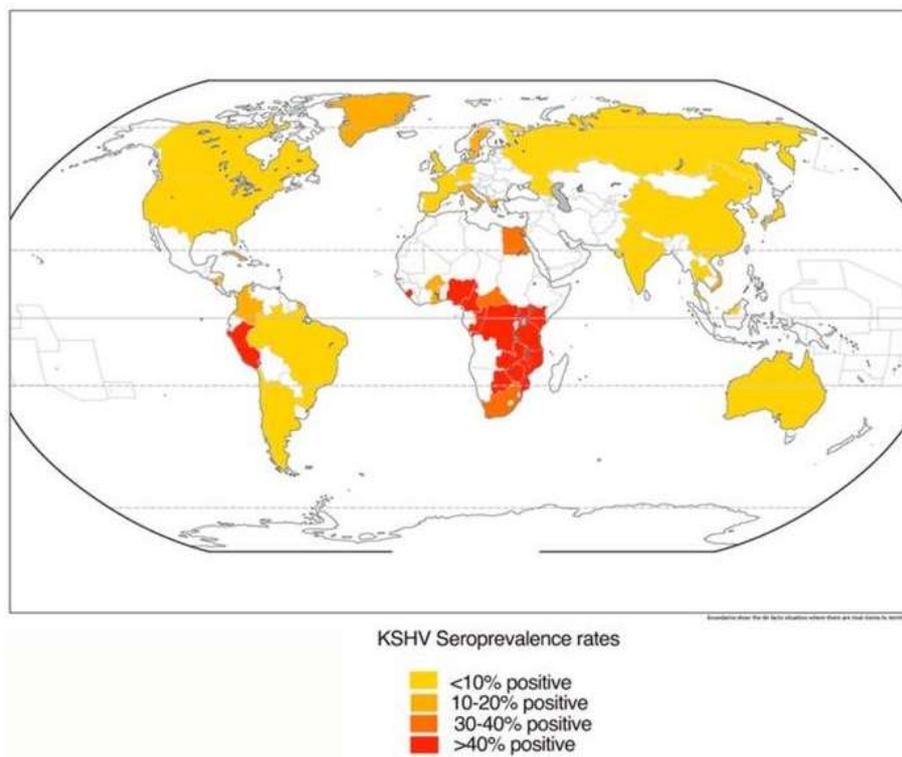
O vírus herpes 8 (HHV-8), também conhecido como KSHV (*Kaposi Sarcoma Herpesvirus*), pertence à família *gammaherpesviridae*, cujos membros são adaptados aos seus hospedeiros imunocompetentes e, por isso, acredita-se que exista uma coevolução que remonta a milhares de anos (WEN; DAMANIA, 2010). Entretanto, em casos de imunossupressão, essa aparente simbiose pode desequilibrar a resposta imunológica do hospedeiro, gerando graves problemas para o indivíduo infectado.

Existem oito tipos de herpesvírus humanos e a maior parte da população encontra-se infectada por um ou mais tipos, visto que sua transmissão ocorre majoritariamente pela saliva e, em um contato contínuo e repetitivo (como entre mãe e filho, ou contato sexual) (MARIGGIÒ; KOCH; SCHULZ, 2017).

Adicionalmente, homens que fazem sexo com homens (HSH) são os mais vulneráveis para infecção pelo KSHV e pelo HIV. Acredita-se que importantes vias de transmissão entre HSH se dão através do uso de saliva como lubrificante durante o sexo anal e sexo oral-anal (BUTLER et al., 2009). A boca tem uma série de defesas antivirais que estão ausentes no ânus, fazendo com que pequenas rupturas no tecido anal sejam pontos de entrada vulneráveis (GONCALVES et al., 2017).

A prevalência do KSHV varia muito entre as populações (figura 3). Em geral, ele é altamente prevalente na África Subsaariana, é de prevalência intermediária no Mediterrâneo e partes da América do Sul, e tem baixa prevalência no norte da Europa, América do Norte e Ásia (GONÇALVES; ULDRICK; YARCHOAN, 2017; MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010).

Figura 3: Prevalência geográfica do KSHV no mundo.

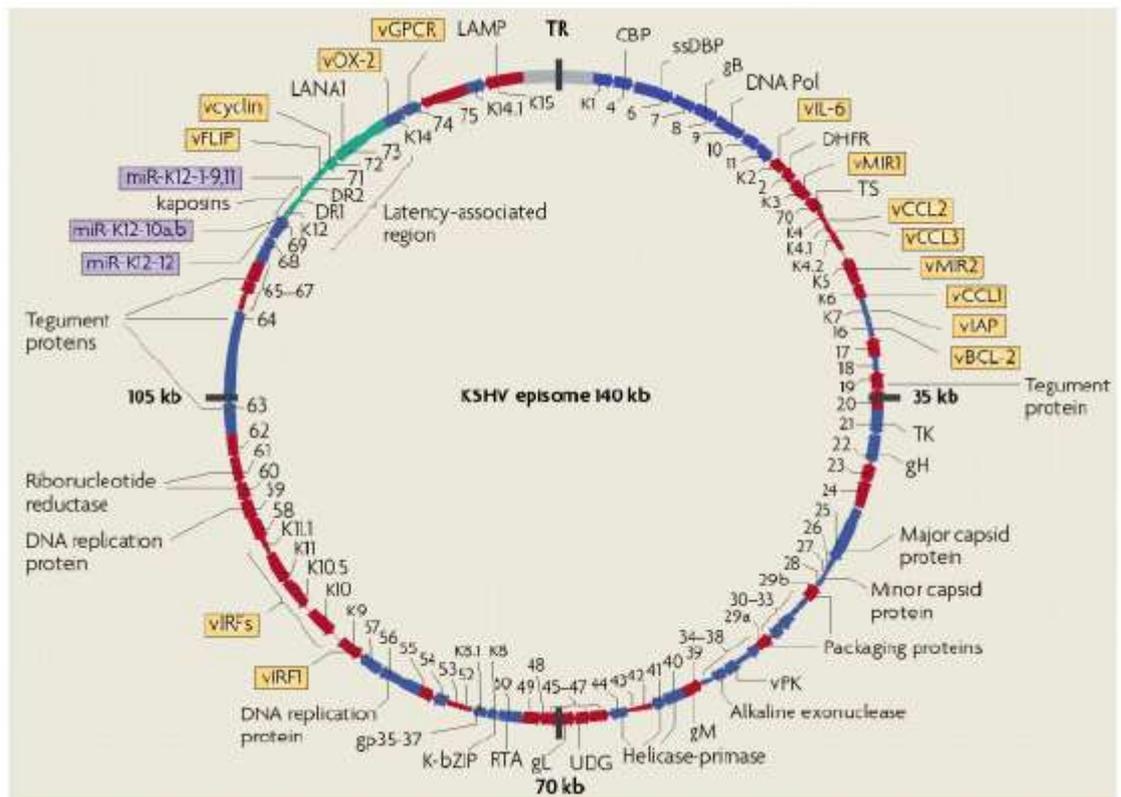


Fonte: Adaptado de Mesri *et al.*, 2010, p.24.

1.2 ESTRUTURA VIRAL

O KSHV possui um DNA de fita dupla (figura 4) e, após a infecção, seu genoma é mantido no núcleo da célula do hospedeiro na forma de epissomo, ficando em latência (GONCALVES et al., 2017; VALIYA VEETTIL et al., 2014). Ao sair desse período de latência, o HHV-8 entra em sua fase lítica e leva a célula infectada à morte (DAVIS et al., 2001).

Figura 4: O Epissomo do KSHV.



Fonte: Adaptado de Mesri et al., 2010, p.6.

O KSHV evoluiu de forma que produziu uma série de proteínas que subvertem o funcionamento natural da célula do hospedeiro para sua sobrevivência. Dessa maneira, ele estabelece uma infecção viral persistente, suprime o *clearance* viral por impedir apoptose e escapa da detecção imune. Esses mecanismos virais de sobrevivência são tidos como contribuintes para a oncogênese relacionada ao SK (WEN; DAMANIA, 2010).

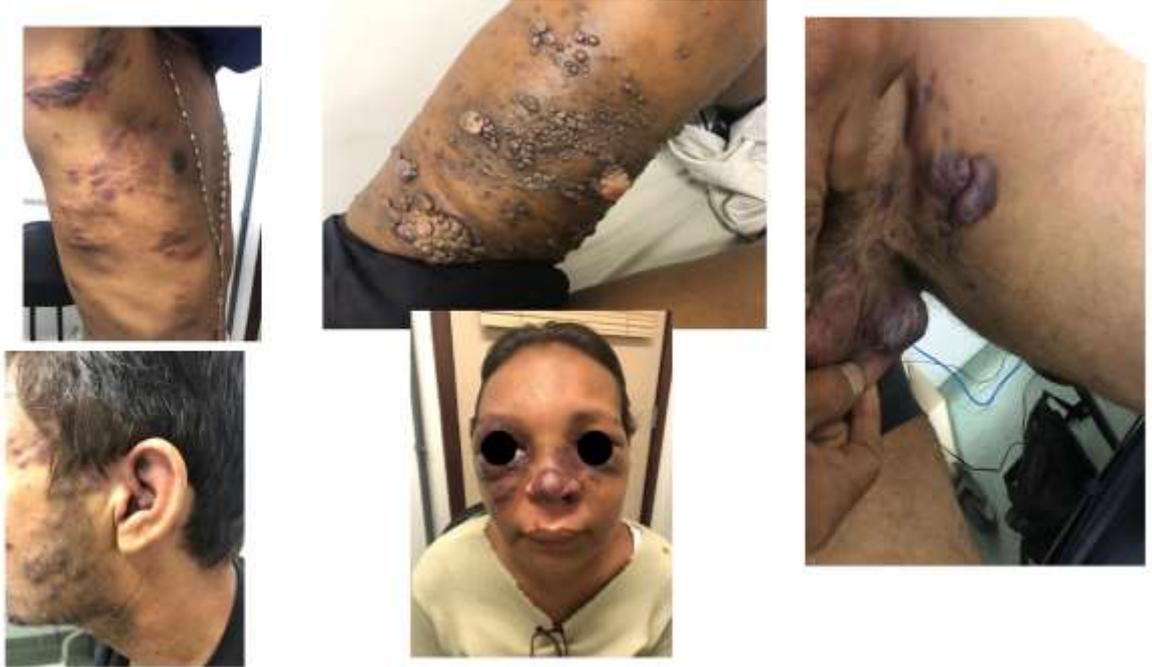
Além disso, o HIV também tem participação na oncogênese do SK. As células infectadas pelo HIV liberam a proteína Tat, que protege e dificulta que as células neoplásicas entrem em processo de morte por apoptose, promovem aumento das células cancerígenas em sinergia com citocinas inflamatórias e aumentam a síntese e liberação de metaloproteinases pelo endotélio, as quais são responsáveis pela degradação da matriz extracelular (CHEUNG; PANTANOWITZ; DEZUBE, 2005).

A infecção pelo KSHV, de células endoteliais e/ou dos progenitores hematopoiéticos, leva a alterações em sua morfologia, metabolismo, taxa de crescimento, tempo de meia-vida e expressão gênica, resultando no SK (DELGADO et al., 2010; MESRI; CESARMAN; BOSHOFF, 2010; MOSES et al., 1999).

1.3 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

As apresentações clínicas são diversas, como pode ser percebido na figura 5, sendo as lesões cutâneas em extremidades, face (principalmente ponta do nariz) e genitália as formas mais comuns da doença. Elas são tipicamente multifocais e papulares, mas em coxas e plantas dos pés podem ser placas. Linfedema extenso pode acontecer, principalmente face, membros inferiores e genitália (CHEUNG; PANTANOWITZ; DEZUBE, 2005). Devemos enfatizar que afeta bastante a estima do paciente e causa profunda influência psicossocial negativa, já que essas lesões de pele acarretam desconforto psicológico nestes pacientes, além de serem estigmatizantes.

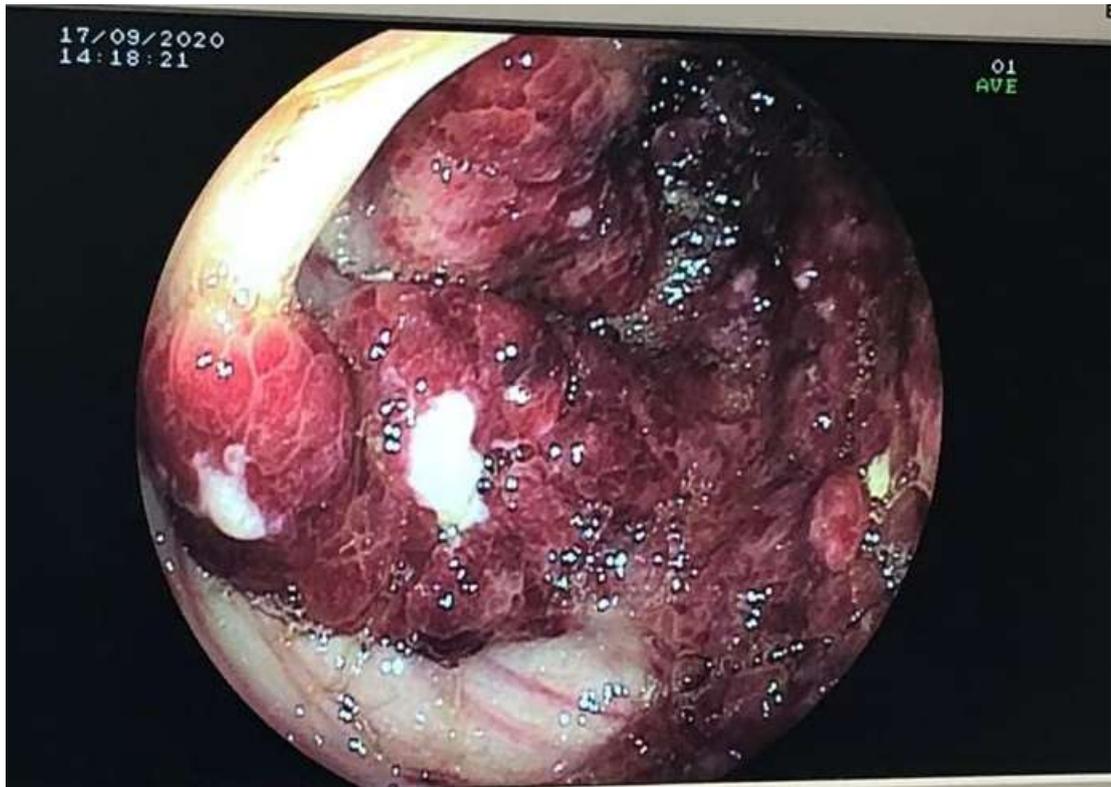
Figura 5: Apresentações clínicas do SK.



Fonte: Acervo pessoal.

Ainda que as lesões cutâneas sejam a forma mais observada da doença, manifestações extra-cutâneas (figura 6) também são esperadas e podem ocorrer mesmo sem lesões de pele (CHEUNG; PANTANOWITZ; DEZUBE, 2005). O SK associado à AIDS é a variante mais comum e agressiva, com frequente acometimento linfonodal e visceral (WEN; DAMANIA, 2010).

Figura 6: Manifestação intestinal do SK.



Fonte: Acervo pessoal.

Para um observador treinado, o diagnóstico preemptivo de SK através das lesões de pele pode ser rápido. Entretanto, a biópsia continua sendo o padrão ouro, visto que recentes estudos confirmam o baixo valor preditivo do diagnóstico clínico (AMERSON et al., 2016). Histopatologicamente pode-se observar quase sempre as células em formato de fuso (que são as infectadas pelo KSHV) (STASKUS et al., 1997) e neoangiogênese misturadas a um infiltrado de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos (CHEUNG; PANTANOWITZ; DEZUBE, 2005; WEN; DAMANIA, 2010). O antígeno nuclear do KSHV associado à latência (LANA) se tornou um marcador definitivo do SK e a sua pesquisa através de testes imunohistoquímicos já é realizada rotineiramente (PEREIRA; CUZZI; GALHARDO, 2013). Entretanto, a expressão do LANA também pode ocorrer em outras condições associadas ao KSHV (como as descritas em seguida) (CESARMAN, 2011).

1.4 OUTRAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO KSHV

O KSHV também é o agente causal da forma plasmablástica da Doença Multicêntrica de Castleman (*Multicentric Castleman disease* – MCD), do linfoma de efusão primária (*Primary effusion lymphoma* - PEL) e, da recentemente descrita síndrome inflamatória por citocinas relacionada ao KSHV (KICS, do inglês *Kaposi Sarcoma herpesvirus Inflammatory Cytokine Syndrome*) e, não raramente os pacientes apresentam mais de uma doença relacionada ao KSHV (GONCALVES et al., 2017; POLIZZOTTO et al., 2016).

A forma plasmablástica da MCD é uma desordem inflamatória linfoproliferativa causada por proliferação monoclonal de células B, com alta viremia do KSHV e muita produção de citocinas inflamatórias, com progressão rápida e agressiva levando à alta mortalidade (WEN; DAMANIA, 2010). Sua manifestação clínica inclui febre, sudorese noturna, perda ponderal, fadiga, sintomas gastrointestinais e respiratórios inespecíficos, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia e edema (inclusive com derrames cavitários). Laboratorialmente percebe-se elevação de proteína C reativa, hipoalbuminemia, anemia, trombocitopenia, hiponatremia e elevação de imunoglobulinas (GONÇALVES; ULDRICK; YARCHOAN, 2017; NETTO, 2017).

Durante o acompanhamento de uma série de pacientes com alta viremia do KSHV (> 1.000 cópias/mL de plasma) e acentuada produção de citocinas inflamatórias (principalmente Il-6), mas sem o diagnóstico histopatológico de MCD, Polizzotto et al descreveram a KICS (POLIZZOTTO et al., 2016). Para definir um caso como KICS é necessária a presença de duas manifestações clínicas juntamente com cada um dos critérios descritos abaixo (NETTO, 2017; POLIZZOTTO et al., 2016):

1. Manifestações clínicas:
 - a) Sintomas B, febre, fadiga, edema, caquexia, sintomas respiratórios, distúrbio gastrointestinal, linfadenopatia, artralgia e mialgia, alteração de estado mental, neuropatia com ou sem dor.
 - b) Anormalidades laboratoriais: anemia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, hiponatremia.
 - c) Anormalidades radiográficas: linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, derrames cavitários.

2. Evidência de inflamação sistêmica: Proteína C reativa elevada (acima de 0,3 mg).
3. Evidência da atividade viral do KSHV: carga viral no plasma elevada (\geq 1.000 cópias/mL) ou em células mononucleares periféricas (\geq 100 cópias/ 10^6 células).
4. Nenhuma evidência de MDC associada ao KSHV (confirmação histopatológica por biópsia de linfonodo).

O PEL é um tipo de linfoma cavitário raro derivado de clones malignos de células B que estão presentes no pericárdio, pleura e peritônio. Pode se apresentar na forma de serosite, porém, também como doença sólida em linfonodos, pele e outros órgãos. É agressivo, tem progressão rápida e alta mortalidade. O tempo de sobrevida esperado após o diagnóstico é de dois a seis meses (WEN; DAMANIA, 2010).

Ainda que o KSHV tenha sido relacionado a todas essas doenças descritas, a quantidade de DNA viral identificada em cada uma delas não é a mesma. Sendo assim, a quantificação viral pode contribuir para o diagnóstico (JARY et al., 2018). Em amostras de sangue periférico de paciente com doença ativa, a quantidade de DNA do KSHV foi maior em paciente com MCD, seguido por PEL e por último, SK (MARCELIN et al., 2007). Além disso, variações na quantidade de DNA viral foram associadas à progressão ou regressão de SK em pacientes em curso de tratamento (LANEY et al., 2007). Também foi observado um importante aumento da replicação do KSHV em pacientes que desenvolveram KICS, inclusive com elevada letalidade quando comparado com o grupo controle (POLIZZOTTO et al., 2016).

As doenças associadas ao KSHV, como descritas acima, são altamente letais e evoluem de forma rápida. Porém, muitas vezes seu tratamento e diagnóstico não se fazem prontamente pois, além de os pacientes poderem apresentar uma ou mais doenças relacionadas ao KSHV ao mesmo tempo, elas clinicamente podem mimetizar um quadro de sepse, que é plausível no contexto de um paciente com AIDS. Tendo o KSHV sido identificado em todas as formas de SK, e também seu genoma podendo ser identificado na PEL, variante plasmablastica do MCD e KICS (SCHNEIDER; DITTMER, 2017), a quantificação da viremia do KSHV pode ser utilizada de diversas maneiras: como um marcador precoce para o SK, como preditor do risco de desenvolvimento da doença, da severidade da doença e também como preditor da resposta clínica ao tratamento (HAQ et al., 2016; NUGENT et al., 2017; POLSTRA et

al., 2003), além de colaborar no diagnóstico diferencial entre sepse e síndrome inflamatória pelo KSHV.

1.5 METODOLOGIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

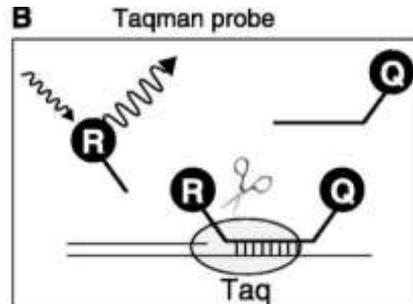
A metodologia de PCR foi desenvolvida em 1980 por Kary e Mullis e é uma das técnicas dominantes da biologia molecular atualmente. É um método sensível que possibilita a amplificação de trechos específicos do DNA para comparação de diferentes amostras e verificação da concentração da molécula, sem necessidade de um organismo vivo. Ela é constituída por três etapas: desnaturação (separação da fita dupla de DNA em dois filamentos), pareamento (oligonucleotídeos iniciadores reconhecem as extremidades da sequência alvo por complementariedade de bases nitrogenadas) e polimerização (enzima DNA polimerase adiciona nucleotídeos à cadeia crescente de DNA) (MALHEIROS, JESSICA, 2017).

A metodologia de PCR em tempo real quantitativo (qPCR) é uma técnica que permite a amplificação específica do genoma viral e sua quantificação em tempo real, o que é possível pela adição de uma sonda (oligonucleotídeo marcado com fluoróforo) à reação, que pareia ao DNA alvo numa região delimitada entre os oligonucleotídeos. Para quantificação utiliza-se uma curva padrão com DNA de interesse, em diluições com concentrações conhecidas e que irão servir de referência (HEID et al., 1996). Esse DNA de interesse pode ser introduzido na forma de um plasmídeo contendo um inserto correspondente ao alvo da PCR, ou de uma curva sintética, análoga a um fragmento genômico do vírus, sendo a curva sintética uma metodologia mais simples, por não depender de laboratório especializado em organismos geneticamente modificados (OGMs), mais barata e prática, podendo ser sintetizada de forma semelhante aos oligonucleotídeos utilizados na mesma reação.

A reação pelo sistema de sondas de hidrólise (Taqman®) é um dos métodos utilizados para detectar os produtos da PCR em equipamentos conhecidos como termocicladores em tempo real. Ela contém um fluoróforo *reporter* que emite um comprimento de onda que é absorvido pelo *quencher* e, durante a amplificação, a DNA polimerase cliva a sonda, liberando assim o *reporter* do *quencher* e permitindo que a

fluorescência seja mensurada pelo sistema ótico do equipamento, como demonstrado na figura 7 (VALASEK; REPA, 2005).

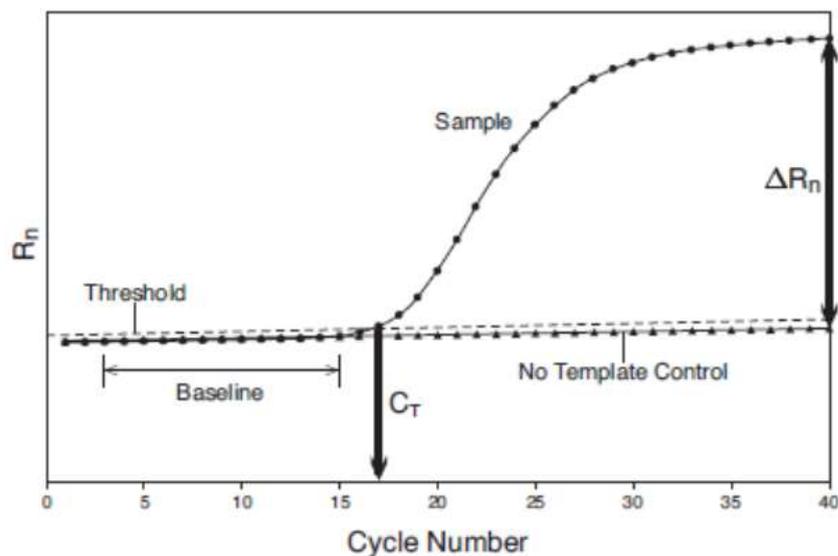
Figura 7: Geração de sinal fluorescente a partir de sonda Taqman®.



Fonte: Valasek; Repa, 2005.

O nível de fluorescência passa a ser detectado quando atinge o ponto limiar da fase exponencial da reação, o que determina o limiar de detecção (*threshold*). Ele será a referência para a determinação de ciclos necessários para que a fluorescência seja detectável (*cycle threshold – Ct*), como pode ser visto na figura 8. Quanto menor o Ct, maior será o número de moléculas de DNA presentes na amostra alvo (MALHEIROS, JESSICA, 2017).

Figura 8: Gráfico de amplificação da qPCR.



Fonte: Applied Biosystems, 2016.

Assim, a qPCR consiste na conversão dos sinais fluorescentes de cada reação em um valor numérico para cada amostra (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016), o que permite que a carga viral seja mensurada e monitorada em poucas horas e a tomada de decisão clínica seja acelerada.

Muito ainda se discute sobre qual material clínico (plasma ou soro) seria o ideal para quantificação da carga viral do HHV-8. Acredita-se que o soro seria preferível, visto que no plasma existem fatores inibidores da reação de PCR que nem sempre podem ser completamente removidos durante o isolamento e purificação do DNA (DE OLIVEIRA LOPES et al., 2020; POLSTRA et al., 2003). Os inibidores de PCR são um grupo heterogêneo de substâncias químicas que estão presentes em diversas matrizes, como, por exemplo, os fatores de coagulação, gorduras e produtos da hemólise; e, presume-se que esses inibidores afetem diretamente o material genético e não as enzimas da reação (SCHRADER et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil tem a maior população HIV/AIDS da América Latina, onde observa-se prevalência de 0,6% na população geral e 14,2% entre HSH (HOAGLAND et al., 2017). A coorte do INI é aberta e recebe pacientes de todo o Rio de Janeiro, sejam eles encaminhados ou por demanda espontânea. Atualmente ela conta com, aproximadamente, 7.751 pacientes infectados pelo HIV acompanhados desde 1986, sendo 4.672 pacientes ativos.

Sendo o INI um serviço de referência para o tratamento e acompanhamento de pacientes com SK e AIDS, a implementação de uma técnica de PCR em tempo real para quantificação da carga viral do KSHV, se faz fundamental para um diagnóstico diferencial ágil em pacientes que apresentem formas clínicas graves, em que muitas vezes a definição entre sepse bacteriana ou KICS não se faz clara. As duas condições clínicas apresentam tratamentos distintos, que precisam ser instituídos de forma rápida. Além disso, a qPCR também auxiliaria no diagnóstico de outras doenças associadas ao KSHV, como MCD e PEL.

A implementação de uma metodologia com utilização de curva sintética para elaboração da curva padrão facilitaria o processo por não depender de laboratório especializado em organismos geneticamente modificados e ser mais barata e prática.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Implementar a técnica da PCR em tempo real para quantificação da carga viral do KSHV em pacientes infectados pelo HIV e diagnóstico de Sarcoma de Kaposi, que apresentem formas clínicas graves, bem como para auxiliar no diagnóstico de outras doenças associadas ao KSHV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Adaptar a técnica de PCR em tempo real para HHV-8/KSHV aos equipamentos disponíveis na Plataforma Multiusuário do INI.

Elaborar POP (procedimento operacional padrão) com a descrição de todas as etapas do exame de quantificação de carga viral do HHV-8/KSHV.

Elaborar POP/Fluxo, com a finalidade de auxiliar os profissionais médicos a identificar os pacientes para os quais seja indicada a realização da investigação, a forma de coleta, e armazenamento do material a ser analisado, bem como elaborar formulário de solicitação do exame, que permita a coleta de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes avaliados.

Avaliar qual material clínico (soro ou plasma) é preferível para realizar a quantificação do HHV-8/KSHV, ou se ambos são equivalentes.

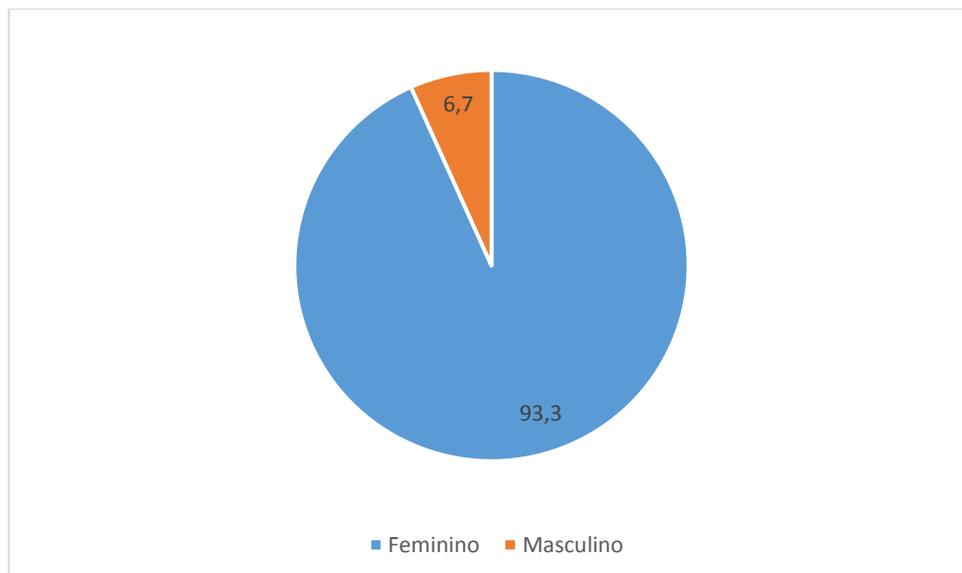
4 METODOLOGIA

4.1 ESQUEMA EXPERIMENTAL E AMOSTRAS UTILIZADAS

Foram utilizadas amostras de material biológico (plasma EDTA e soro) coletadas de 45 pacientes que iniciaram tratamento quimioterápico para Sarcoma de Kaposi no INI no período de abril de 2011 a dezembro de 2013 e que estão armazenadas no tanque de nitrogênio líquido do Laboratório de Pesquisa Clínica em DST-AIDS a -80°C . Essas amostras foram utilizadas em projeto prévio (registro no Comitê de Ética em Pesquisa do INI com número 0010.0.009.000-11) e tem a carga viral quantificada através da técnica de qPCR com utilização de plasmídeo (NETTO, 2017). As amostras coletadas permaneceram armazenadas em tanque de nitrogênio líquido à -80° até análise, conforme indicado no Apêndice A.

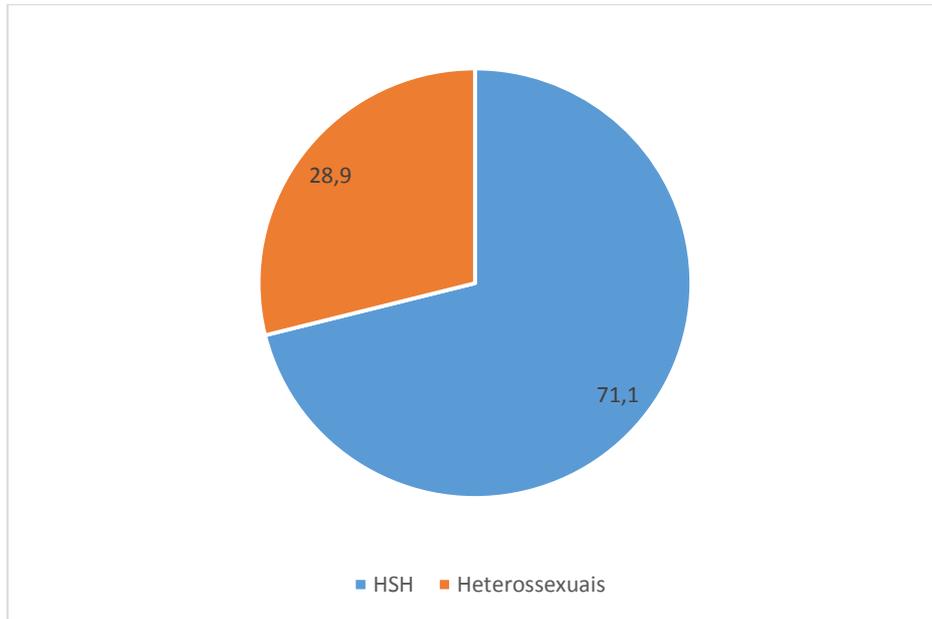
A maior parte dos pacientes analisados eram homens (gráfico 1) que fazem sexo com homens (gráfico 2) e com menor tempo de educação formal (gráfico 3). Além disso, 13 apresentaram Síndrome Inflamatória de Reconstituição Imune (IRIS) e 5 foram a óbito devido ao SK.

Gráfico 1: Distribuição dos pacientes de acordo com sexo.



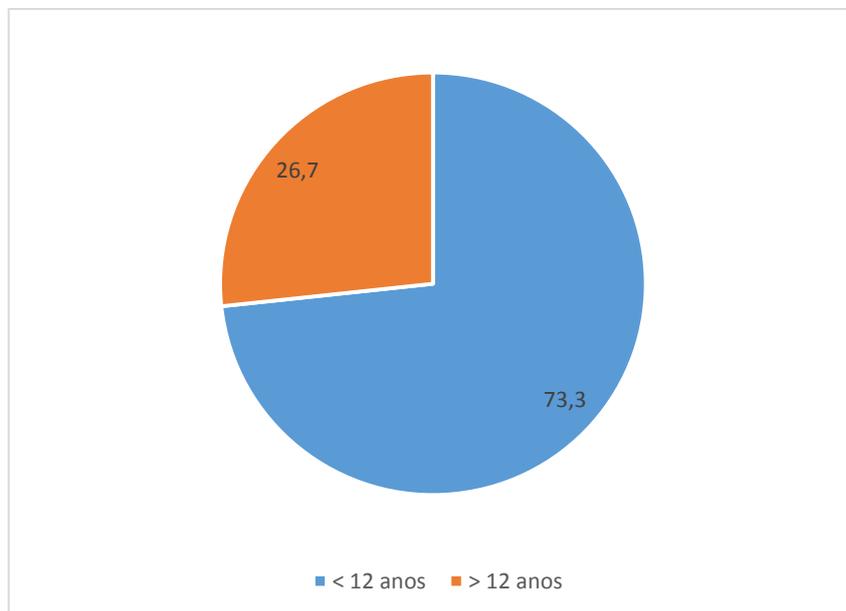
Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 2: Distribuição dos pacientes de acordo com orientação sexual.



Fonte: Elaboração própria.

Gráfico 3: Distribuição dos pacientes de acordo com tempo de ensino formal.



Fonte: Elaboração própria.

4.2 BIOSSEGURANÇA

Todas as etapas laboratoriais foram realizadas de acordo com o manual de Biossegurança da Fiocruz, com os respectivos equipamentos de proteção individual e coletiva recomendados. Todas as amostras foram processadas em cabine de segurança biológica previamente desinfetada e submetida à luz ultravioleta por 20 minutos. Cada etapa do processamento foi realizada em salas segregadas e com fluxo unidirecional.

4.3 PREPARO DE REAGENTES DA PCR EM TEMPO REAL

4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA viral das amostras dos pacientes foi realizada com o *kit* “*Hight Pure Viral Nucleic Acid*” da Roche conforme demonstrado no Apêndice B, e em todos os ensaios foi incluído um controle negativo de extração, correspondente à água livre de nuclease.

4.3.2 ANÁLISE DOS OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES (*PRIMERS*) E SONDA (*PROBE*)

Para esse ensaio foram selecionados *primers* e *probe* de acordo com o protocolo publicado por Levi et al (LEVI et al., 2011) que detectam um fragmento de 74 pares de bases no gene da proteína do capsídeo do KSHV, o qual é codificado pela ORF26, cuja região do genoma é altamente conservada entre os isolados virais.

Utilizamos a ferramenta NBCI *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*) para avaliar a especificidade do par de *primers* e *probe* selecionados para o ensaio. Este programa possibilita a análise de sequências em banco de dados biológicos, além de mostrar alinhamentos e o grau de identidade com a sequência que se deseja estudar. O *score* informa o grau de similaridade entre a sequência do estudo e a introduzida. Dessa forma, quando maior o valor, mais similar. O valor de E (*expected*) indica a significância do resultado da pesquisa. Assim, quanto menor o E, mais significativo é o resultado, ou seja, uma baixa probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso (MALHEIROS, JESSICA, 2017).

Tabela 1 - *Primers e probe* que foram usadas para detecção e quantificação do HHV-8.

| HHV-8 | | Sequência (5'→3') | Score | E | % cobertura | Tamanho | % GC | Localização* | Tm médio (°C) |
|---------------|-----------|-----------------------------|-------|------|-------------|---------|------|----------------|---------------|
| <i>Primer</i> | Senso | GGGCCCCGGATGATGTA | 34,2 | 44 | 100% | 17 | 64,7 | nt 47522-47538 | 58,6 |
| | Antisenso | GCCCCATAAATGACACATTGG | 42,1 | 0,18 | 100% | 21 | 47,6 | nt 47567-47587 | 58,6 |
| <i>Sonda</i> | | FAM-AGATCAAGTTCCGCCATAT-MGB | 38,2 | 2,8 | 100% | 19 | 42,1 | nt 47540-47558 | 69 |

*Nucleotídeos (nt) estão numerados de acordo com a sequência referência de HHV8 disponível no *GenBank* (NC_009333.1)
 Fonte: Elaboração própria a partir do *NBCI Blast* (2021).

4.3.3 PADRONIZAÇÃO DO THRESHOLD

Como não é aconselhável ajustar o *threshold* entre diferentes experimentos, foi utilizada a padronização no valor de 0,04. Esse valor foi considerado adequado para avaliar individualmente as placas contendo as amostras dos pacientes, garantindo a uniformização da interpretação dos resultados.

4.4 PROCEDIMENTO DA PCR EM TEMPO REAL

Duas metodologias foram utilizadas para construção da curva padrão: oligonucleotídeo sintético (curva sintética) conforme descrito previamente (DE OLIVEIRA LOPES et al., 2020), a qual foi sintetizada pela *Thermo Fischer Scientific Baltics*, e gBlock construído para esse ensaio, sintetizada pela *Integrated DNA Technologies*.

O master mix utilizado foi *TaqMan Universal Master Mix II, with UNG* e o termociclador foi o *QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR Systems*, ambos produzidos pela *Thermo Fischer Scientific Baltics*. As etapas da qPCR estão descritas no apêndice C.

4.4.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO COM CURVA SINTÉTICA

Uma das metodologias aplicadas para construção da curva padrão foi com a utilização de oligonucleotídeo sintético do tipo fita simples, conforme descrito previamente (DE OLIVEIRA LOPES et al., 2020).

Tabela 2 - Sequência da curva sintética.

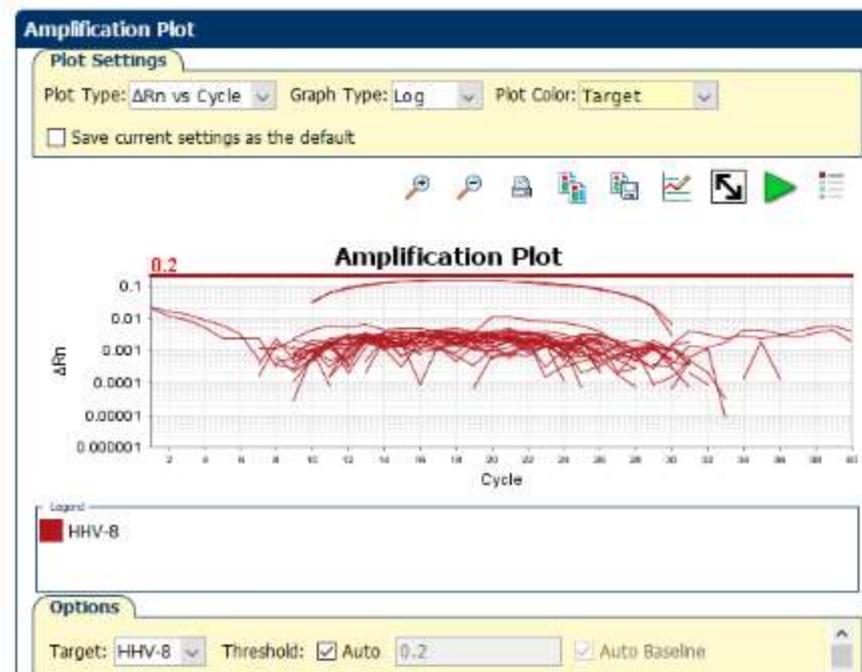
| HHV-8 | Sequência (5' → 3') | Tamanho |
|-----------------|---|---------|
| Curva sintética | TTCGTGCCCCATAAATGACACATTGGCGTATATATGGCGG AACTTGATCTATGCGTTACATCATCCGGGGCCCCTGATA | 79 nts |

Fonte: Elaboração própria.

Para reconstituição da curva sintética, 1 mL de água livre de nuclease foi utilizada para ressuspender cerca de 24,8 nmoles de curva sintética de 79 nts. Em seguida, a

curva foi então, diluída mil vezes utilizando pipeta eletrônica. A partir daí, foi realizada diluição seriada 1:10 e, então, aplicado o protocolo de qPCR descrito por Levi et al (LEVI et al., 2011) a 65°C com 400 nmol de *primer* e 160 nmol de *probe*. As diluições não apresentaram resultados consideráveis (figura 9):

Figura 9: Não amplificação com curva sintética no ensaio descrito por Oliveira et al a 65°C com 400 nmol de *primer* e 160 nmol de *probe*.



Fonte: Elaboração própria.

4.4.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO COM GBLOCK

A outra estratégia metodológica foi a construção de um oligonucleotídeo sintético único (gBlock) constituído por DNA fita dupla, com conseqüente maior similaridade com o genoma de KSHV, como pode ser observado na tabela 3. Para construção do gBlock foi selecionada uma região do genoma do KSHV que compreendesse os insumos (*primer* e *probe*), já adquiridos, baseado no protocolo de Levi et al (LEVI et al., 2011).

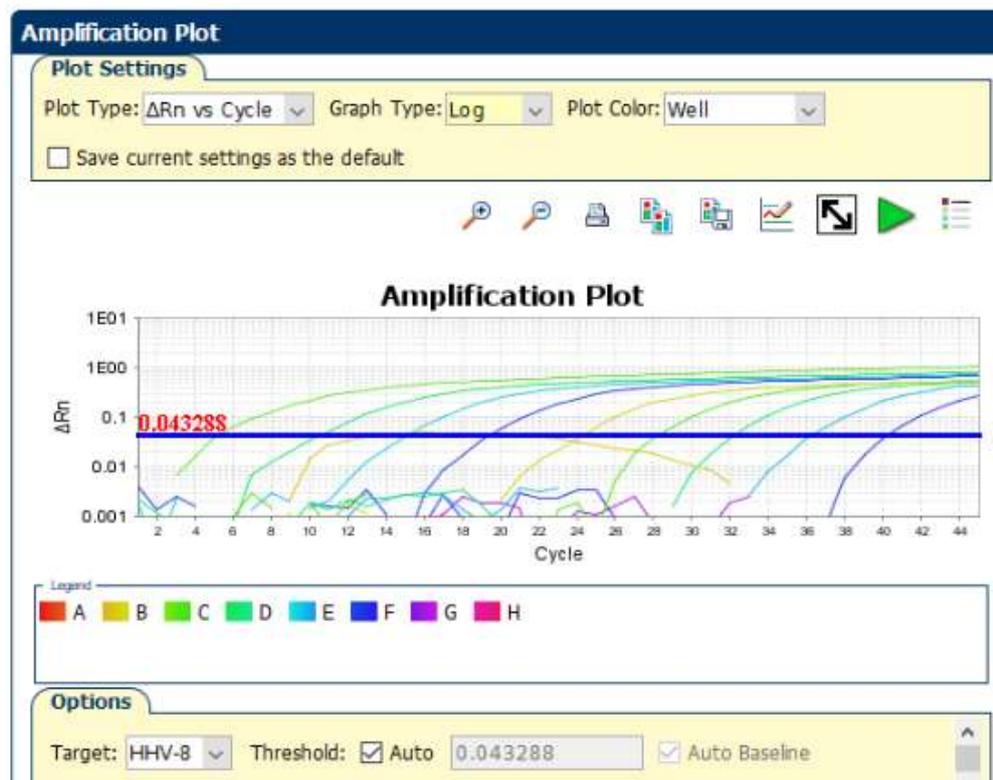
Tabela 3 - gBlock que foi utilizado para construção da curva padrão.

| HHV-8 | Sequência (5' → 3') | Tamanho |
|--------|--|---------|
| | CTGTTGGTGTACCACATCTACTCCAAAATATCGGCCGGGGCCC | |
| gBlock | CGGATGATGTAAATATGGCGGAACTTGATCTATATAACCAAT GTGTCATTTATGGGGCGCACATATCGTCTGGACGTAGACAACAC | 131 pb |

Fonte: Elaboração própria.

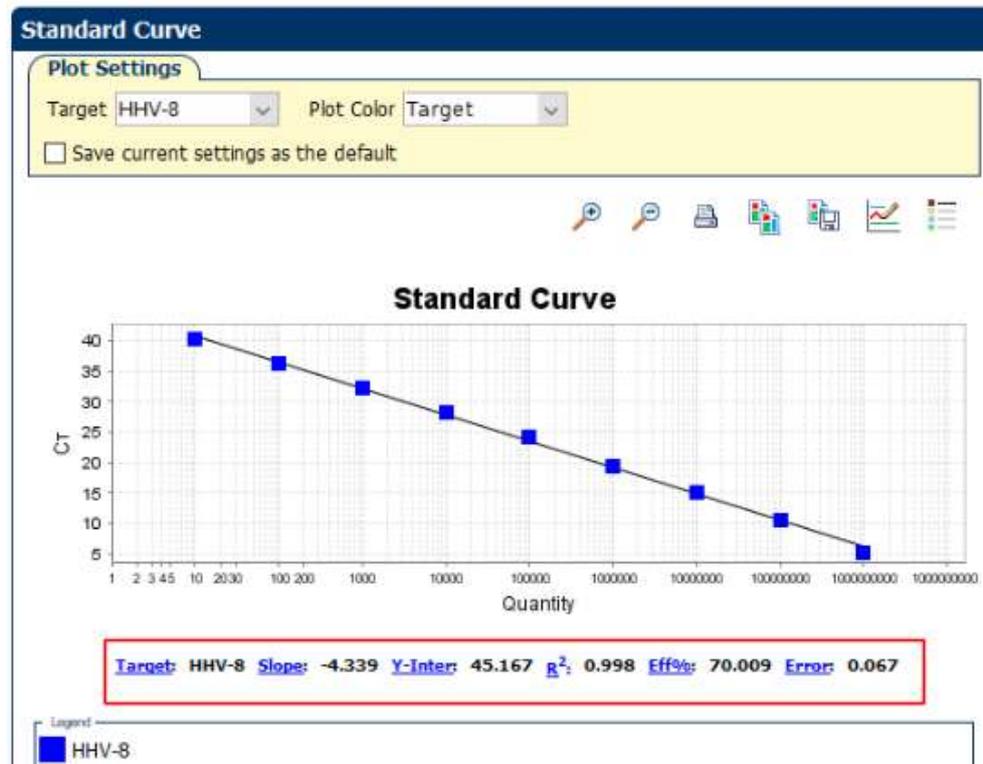
Para reconstituição do oligonucleotídeo, 250 ng do gBlock foram ressuspensos em 25 µL de água livre de nuclease (obtendo-se uma concentração final 10 ng/µL). Em seguida, foi aplicada a fórmula contida na bula do fabricante, achando uma concentração de $0,7449214 \times 10^{11}$ cópias genômicas/µL. A solução estoque foi diluída de forma seriada 1:10, e as otimizações obtidas na tentativa de padronização utilizando a curva sintética foram aplicadas (anelamento a 55°C, *input* de DNA 5 µL e aumento das concentrações dos insumos na reação com 900 nmol *primer* e 250 nmol de *probe*), conforme demonstrado nas figuras 11 e 12.

Figura 11: Amplificação utilizando gBlock.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 12: Curva padrão construída com gBlock.



Fonte: Elaboração própria.

4.5 ELABORAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO

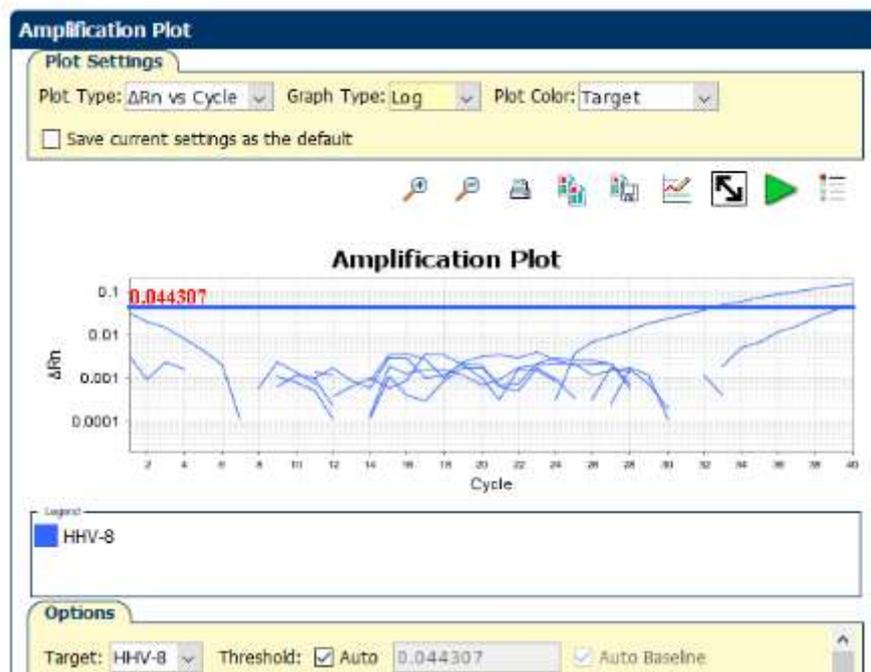
Os POPs foram construídos seguindo por base manuais de instruções dos kits utilizados além dos protocolos de reações já publicados previamente, conforme explicitado na referência de cada apêndice.

5 RESULTADOS

5.1 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO COM CURVA SINTÉTICA

Como não foi possível a construção da curva padrão de acordo com o protocolo descrito por Oliveira Lopes e colaboradores (DE OLIVEIRA LOPES et al., 2020), iniciamos uma série de testes para entender o motivo das diluições não terem apresentado resultados consideráveis. Dessa forma, foi aplicada a temperatura de anelamento compatível com o master mix utilizado (*TaqMan Universal Master Mix II, with UNG*), conforme as indicações do fabricante (60°C com 400 nmol de *primer* e 160 nmol de sonda). Alguns pontos de fluorescência foram observados, porém, com possível exaustão dos reagentes nos ciclos iniciais (figura 13).

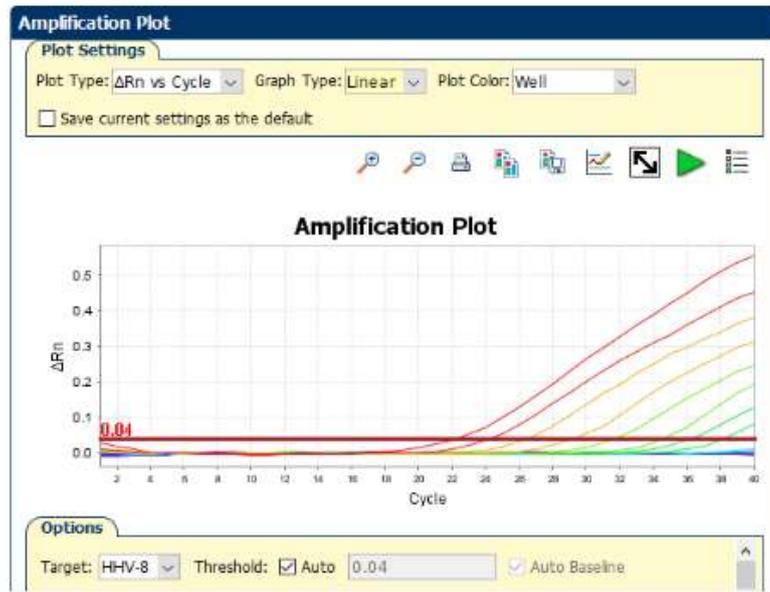
Figura 13: Adaptação do protocolo de acordo com temperatura de anelamento indicado pelo fabricante.



Fonte: Elaboração própria.

Uma terceira adaptação foi realizada, dessa vez com ensaio a 55°C e 1 e 5 μL de *input* de DNA e melhores Cts de amplificação foram observados (figura 14):

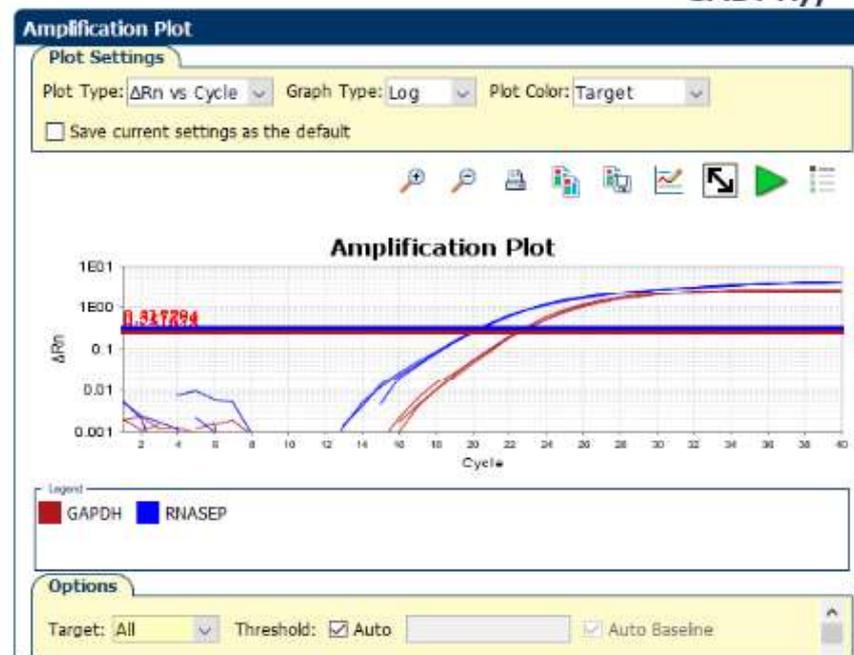
Figura 14: Adaptação do protocolo de acordo com temperatura de 55 °C 1 e 5 μ L de *input*.



Fonte: Elaboração própria.

Uma possibilidade também testada para justificar a baixa *performance* da curva sintética foi verificar a viabilidade do master mix com distintas amostras: amplificando amostras dos pacientes previamente extraídas para o gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e, amplificando um plasmídeo contendo inserto para RNaseP para esse referido alvo, o que comprovou a viabilidade do insumo (figura 15).

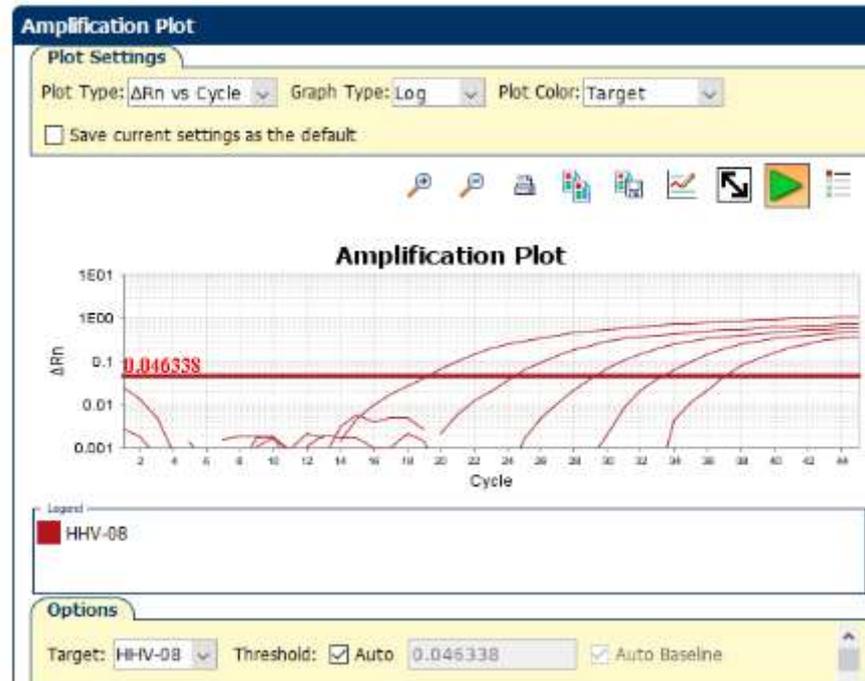
Figura 15: Teste de viabilidade do master mix.



Fonte: Elaboração própria.

Dessa forma, foi tentado otimizar a reação de qPCR aumentando as concentrações dos insumos na reação (900 nmol *primer* e 250 nmol de *probe*) e uma maior relação delta RN (eixo y) com Cts menores foi encontrada. Porém, não alcançamos o *range* de pontos da curva e seus respectivos Cts, conforme sugerido por Oliveira Lopes et al (DE OLIVEIRA LOPES et al., 2020)(figura 16).

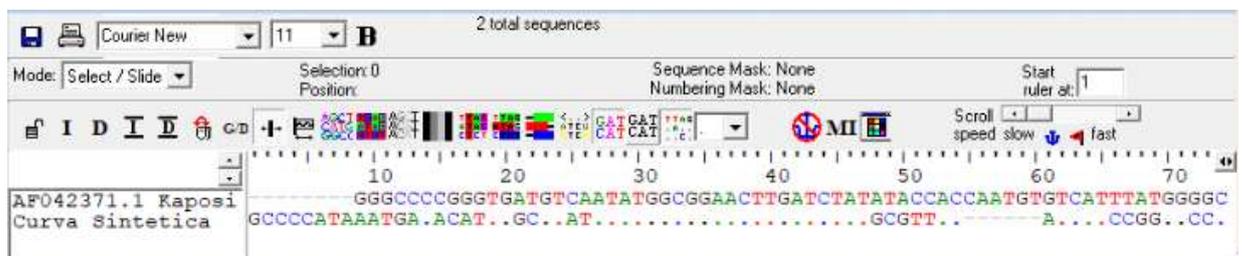
Figura 16: Otimização da reação de qPCR.



Fonte: Elaboração própria.

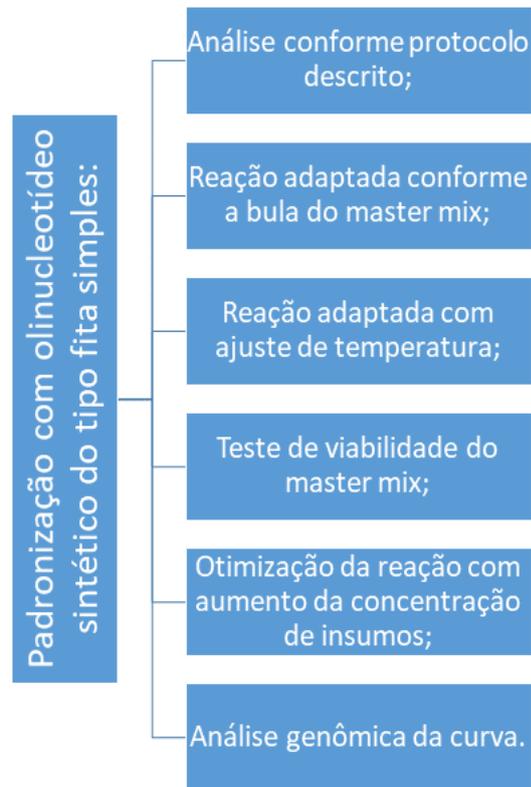
Ao analisar a sequência nucleotídica da curva sintética descrita percebe-se que ela não reproduz, em toda a sua cobertura, uma sequência referência do KSHV (figura 17). É possível que uma hibridização menos eficiente do par de primers e sonda justifique os resultados encontrados. Como a quantificação do HHV-8 será utilizada na prática médica para tomada de decisão clínica, optou-se por não utilizar essa metodologia.

Figura 17: Identidade entre curva sintética e HHV-8 denotada por pontos, avaliada por meio do *software* BioEdit v7.2.5.



Fonte: Elaboração própria.

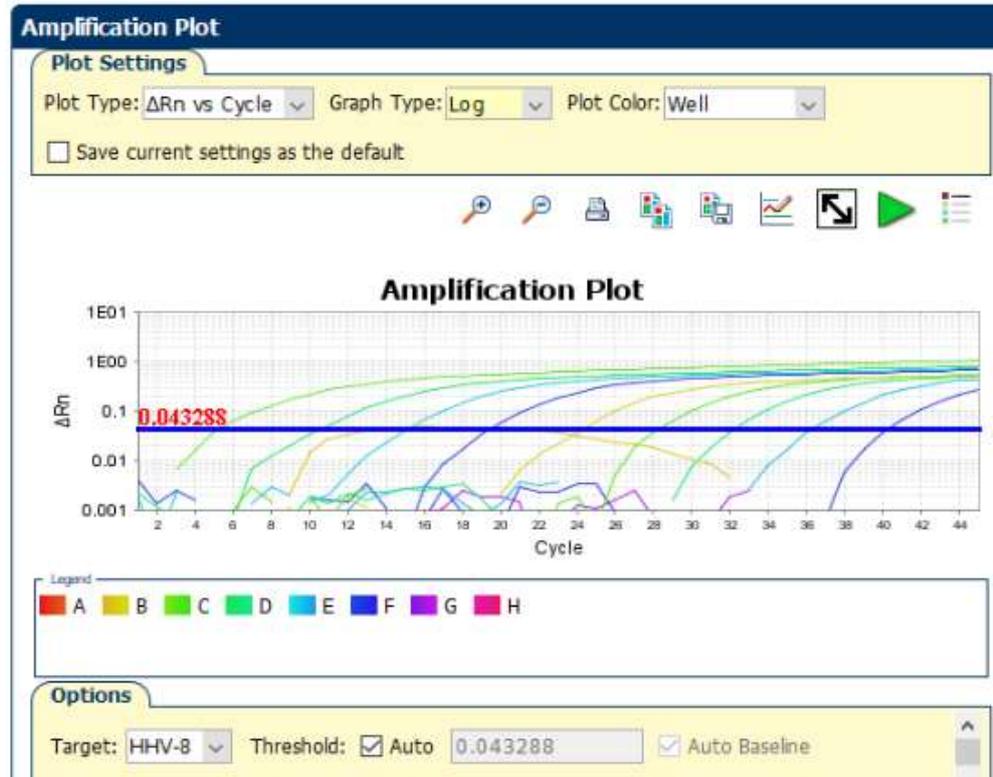
Figura 18: Etapas envolvidas na tentativa de construção da curva padrão utilizando oligonucleotídeo sintético do tipo fita simples.



Fonte: Elaboração própria.

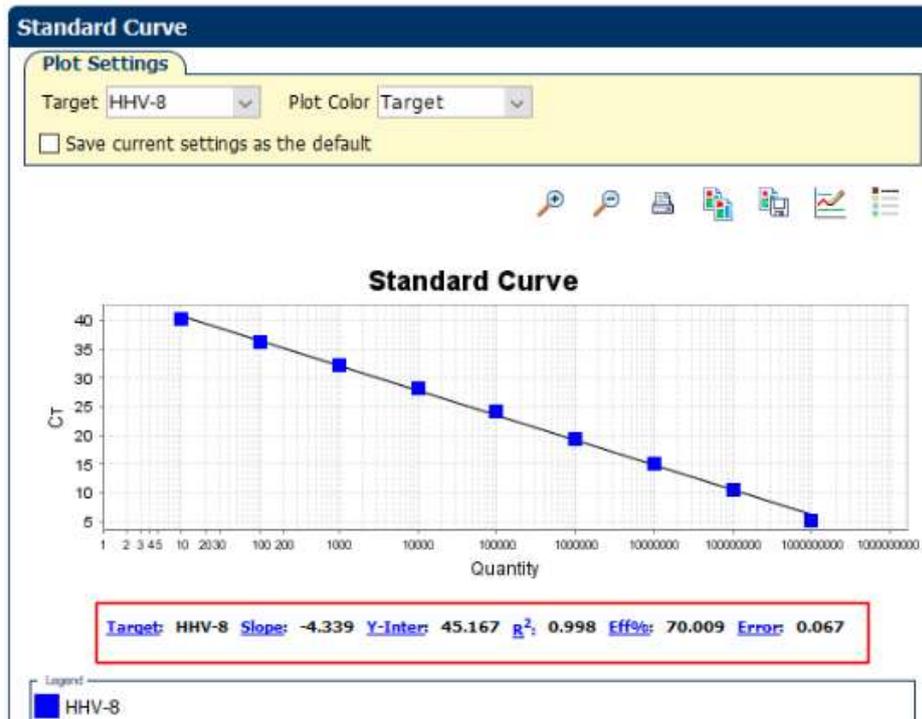
5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO COM gBLOCK

Figura 11: Amplificação utilizando gBlock.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 12: Curva padrão construída com gBlock.



Fonte: Elaboração própria.

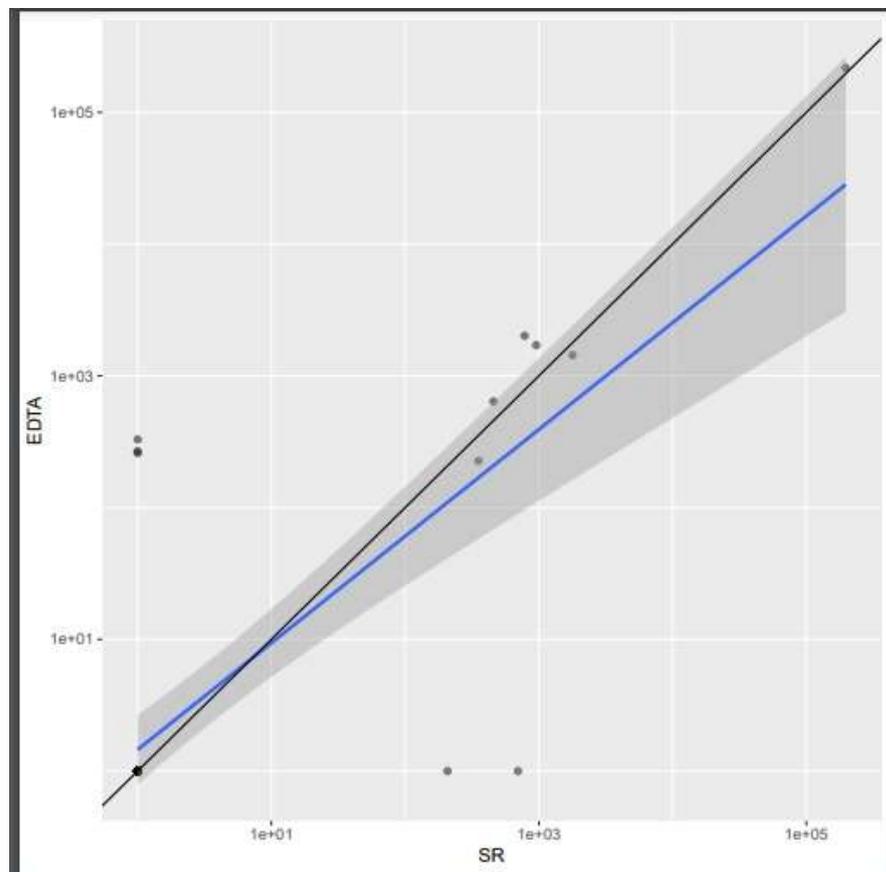
A análise do valor de R^2 auxilia na avaliação do desempenho do par de *primers* e na pipetagem precisa da amostra. Esse coeficiente é obtido durante a construção da curva padrão, e o ideal é que seja maior que 0,99. No presente estudo o valor do coeficiente encontrado é 0,998.

A eficiência da qPCR idealmente é de 100% (com slope -3,32) e a obtida nesta análise foi de 70% (com slope -4,339), significando que a cada ciclo 70% das moléculas de DNA são duplicadas. Além disso, o limite de quantificação (LoQ) neste ensaio foi de 0,745 cópias/reação ou 32,3 cópias/mL.

5.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE PLASMA EDTA E SORO UTILIZANDO O GBLOCK

Ao comparar os resultados (cópias genômicas/mL) obtidos com amostras de plasma EDTA e soro, podemos observar pelo gráfico 1 que são concordantes.

Gráfico 1: Comparação entre resultados (cópia genômicas/mL) de plasma EDTA e soro.



Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A qPCR permite que a carga viral do KSHV seja mensurada e monitorada em poucas horas e a tomada de decisão clínica seja acelerada, o que é fundamental em pacientes que apresentem formas clínicas graves da infecção pelo KSHV (com mais de 1000 cópias/mL) em que muitas vezes a definição entre sepse bacteriana ou KICS não se faz clara e que o tratamento é distinto e precisa ser instituído de forma rápida. A implementação de uma metodologia com utilização de curva sintética para elaboração da curva padrão facilitaria o processo por ser mais simples, já que não depende de laboratório especializado em organismos geneticamente modificados (OGMs), é mais barata e prática, podendo ser sintetizada de forma semelhante aos oligonucleotídeos utilizados na mesma reação.

Dessa forma, inicialmente, tentou-se reproduzir uma técnica já previamente descrita que utilizava oligonucleotídeo fita simples (LEVI et al., 2011). Entretanto, mesmo após diversos ajustes, não foi possível elaborar uma curva padrão aceitável. Isso aconteceu provavelmente porque a sequência nucleotídica não reproduzia o HHV-8 em sua totalidade, o que poderia gerar uma hibridização menos eficiente. Como a quantificação do HHV-8 será utilizada na prática médica para tomada de decisão clínica, optou-se por não utilizar essa metodologia.

Assim, criamos o gBlock, que é um oligonucleotídeo sintético único constituído por DNA fita dupla, que tem maior similaridade com o genoma de KSHV visando, dessa forma, contornar o acontecido com a curva sintética fita simples. A eficiência e o LoQ obtidos nesse ensaio ainda não foram ideais e é possível que esse resultado se deva ao fato de *probe* e *primers* utilizados, terem sido reproduzidos da literatura, sem necessariamente representar o melhor *set* para amplificação na mesma ORF 26. Além disso, o grupo de pesquisadores Levi et al (LEVI et al., 2011), ao publicar a sequência nucleotídica de *primers* e *probe* não menciona os parâmetros obtidos em sua qPCR para que se possa fazer uma comparação com o estudo atual.

Não foi possível realizar a comparação desta metodologia com a que utiliza plasmídeo (NETTO, 2017) (e consequente validação externa) pelos seguintes motivos: as amostras utilizadas neste estudo foram coletadas e quantificadas utilizando o plasmídeo há aproximadamente 10 anos, a extração do DNA foi feita com *kits* diferentes, *primers* e sonda utilizados também foram distintos, com consequente ciclagem diferente, e as regiões da ORF26 utilizadas como alvo não são equivalentes.

Por fim, os equipamentos em tempo real também não são do mesmo fabricante. Dessa forma, não haveria uniformização que possibilitasse uma comparação. Assim, optamos por manter a utilização do plasmídeo para quantificação da carga viral do KSHV enquanto, em projeto futuro, melhoraremos a performance do gBlock para que sua utilização possa ser validada.

7 CONCLUSÃO

Foi implementada a técnica da qPCR para quantificação da carga viral do KSHV em pacientes infectados pelo HIV e com diagnóstico se SK que apresentem formas clínicas graves. Essa metodologia foi adaptada aos equipamentos disponíveis na Plataforma Multiusuário do INI com elaboração de curva padrão com utilização, nesse momento, de plasmídeo. Além disso, foram elaborados POPs com descrição de todas as etapas do exame (coleta, extração do DNA e qPCR) e criação de formulário de solicitação do exame e um fluxograma com indicação de coleta, a fim de auxiliar o clínico responsável pelo atendimento a identificar quais pacientes devem ter material coletado para análise.

Foi avaliado também qual material clínico seria preferível (plasma EDTA ou soro) para quantificação da carga viral do KSHV utilizando-se o gBlock, e ambos se mostraram concordantes. No entanto, a técnica deve ser aperfeiçoada antes de sua implementação, o que será alvo de estudo a ser realizado no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERSON, E. et al. Accuracy of Clinical Suspicion and Pathologic Diagnosis of Kaposi Sarcoma in East Africa. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 71, n. 3, p. 295–301, 1 mar. 2016.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Absolute quantitation using standart curve getting started guide**. Foster city: [s.n.].

BUTLER, L. M. et al. Use of saliva as a lubricant in anal sexual practices among homosexual men. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 50, n. 2, p. 162–167, 1 fev. 2009.

CASTILHO, J. L. et al. HIV and cancer: a comparative retrospective study of Brazilian and U.S. clinical cohorts. **Infectious Agents and Cancer**, v. 10, p. 4, 2015.

CESARMAN, E. Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. **Cancer Letters**, v. 305, n. 2, p. 163–174, 28 jun. 2011.

CHANG, Y. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5192, p. 1865–1869, 16 dez. 1994.

CHEUNG, M. C.; PANTANOWITZ, L.; DEZUBE, B. J. AIDS-related malignancies: emerging challenges in the era of highly active antiretroviral therapy. **The Oncologist**, v. 10, n. 6, p. 412–426, jul. 2005.

DAVIS, D. et al. Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. **Blood**, n. May 15;97(10):3244-50, 2001.

DE OLIVEIRA LOPES, A. et al. Introduction of human gammaherpesvirus 8 genotypes A, B, and C into Brazil from multiple geographic regions. **Virus Research**, v. 276, p. 197828, 15 2020.

DELGADO, T. et al. Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 23, p. 10696–10701, 8 jun. 2010.

FRIEDMAN-KIEN, A. E. Disseminated Kaposi's sarcoma syndrome in young homosexual men. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 5, n. 4, p. 468–471, out. 1981.

GONCALVES, P. H. et al. Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases. **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 1, p. 47–56, 2017.

GONÇALVES, P. H.; ULDRICK, T. S.; YARCHOAN, R. HIV-associated Kaposi sarcoma and related diseases. **AIDS (London, England)**, v. 31, n. 14, p. 1903–1916, 10 2017.

- HAQ, I.-U. et al. The clinical application of plasma Kaposi sarcoma herpesvirus viral load as a tumour biomarker: results from 704 patients. **HIV medicine**, v. 17, n. 1, p. 56–61, jan. 2016.
- HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, out. 1996.
- HOAGLAND, B. et al. Awareness and Willingness to Use Pre-exposure Prophylaxis (PrEP) Among Men Who Have Sex with Men and Transgender Women in Brazil. **AIDS and behavior**, v. 21, n. 5, p. 1278–1287, maio 2017.
- JARY, A. et al. Usefulness of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV) DNA Viral Load in Whole Blood for Diagnosis and Monitoring of KSHV-Associated Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 6, 2018.
- KAPOSI, M. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. p. 4:265-273, 1872.
- LANEY, A. S. et al. Human herpesvirus 8 presence and viral load are associated with the progression of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **AIDS (London, England)**, v. 21, n. 12, p. 1541–1545, 31 jul. 2007.
- LETANG, E. et al. Predictors of immune reconstitution inflammatory syndrome-associated with kaposi sarcoma in mozambique: a prospective study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)**, v. 53, n. 5, p. 589–597, abr. 2010.
- LEVI, J. E. et al. Non-detection of human herpesvirus 8 (HHV-8) DNA in HHV-8-seropositive blood donors from three Brazilian regions. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e23546, 2011.
- MALHEIROS, JESSICA. **Desenvolvimento das metodologias de RT-qPCR e microarranjo líquido multiplex para quantificação dos vírus que compõem a vacina tríplice viral**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2017.
- MARCELIN, A.-G. et al. Relationship between the quantity of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) in peripheral blood and effusion fluid samples and KSHV-associated disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 8, p. 1163–1166, 15 out. 2007.
- MARIGGIÒ, G.; KOCH, S.; SCHULZ, T. F. Kaposi sarcoma herpesvirus pathogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 372, n. 1732, 19 out. 2017.
- MESRI, E. A.; CESARMAN, E.; BOSHOFF, C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 10, p. 707–719, out. 2010.
- MOSES, A. V. et al. Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8. **Journal of Virology**, v. 73, n. 8, p. 6892–6902, ago. 1999.
- NETTO, J. S. **Sarcoma de Kaposi numa coorte de pacientes com HIV/AIDS no Rio de Janeiro: Avaliação da incidência, dinâmica da infecção pelo KSHV,**

fatores clínicos e epidemiológicos associados. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2017.

NGUYEN, H. Q. et al. Persistent Kaposi sarcoma in the era of highly active antiretroviral therapy: characterizing the predictors of clinical response. **AIDS (London, England)**, v. 22, n. 8, p. 937–945, 11 maio 2008.

NUGENT, D. B. et al. Use of plasma human herpesvirus-8 viral load measurement: evaluation of practice in three UK HIV treatment centres. **International journal of STD & AIDS**, v. 28, n. 2, p. 188–191, 2017.

PEREIRA, P. F.; CUZZI, T.; GALHARDO, M. C. G. Immunohistochemical detection of the latent nuclear antigen-1 of the human herpesvirus type 8 to differentiate cutaneous epidemic Kaposi sarcoma and its histological simulators. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 243–246, abr. 2013.

POLIZZOTTO, M. N. et al. Clinical Features and Outcomes of Patients With Symptomatic Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV)-associated Inflammation: Prospective Characterization of KSHV Inflammatory Cytokine Syndrome (KICS). **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 62, n. 6, p. 730–738, 15 mar. 2016.

POLSTRA, A. M. et al. Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5488–5491, dez. 2003.

SCHNEIDER, J. W.; DITTMER, D. P. Diagnosis and Treatment of Kaposi Sarcoma. **American journal of clinical dermatology**, v. 18, n. 4, p. 529–539, ago. 2017.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, nov. 2012.

STASKUS, K. A. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 715–719, jan. 1997.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151–159, set. 2005.

VALIYA VEETTIL, M. et al. Glutamate secretion and metabotropic glutamate receptor 1 expression during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection promotes cell proliferation. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004389, out. 2014.

WEN, K. W.; DAMANIA, B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis. **Cancer Letters**, v. 289, n. 2, p. 140–150, 28 mar. 2010.

APÊNDICE A – FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI.



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 1/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Fundamento do Método*
4. *Siglas*
5. *Condições Gerais*
6. *Condições de Biossegurança*
7. *Materiais para coleta com seringa e agulha*
8. *Procedimentos para coleta*
9. *Procedimentos para processamento*
10. *Referências Bibliográficas*
11. *Histórico da Última Revisão*
12. *Anexos*
Anexo 1 – Pedido de exame médico
Anexo 2 – Fluxograma para indicação de coleta

1. OBJETIVO

Este documento tem como objetivo padronizar e definir regras que devem ser aplicadas na coleta de amostras para quantificação da carga viral do vírus herpes 8.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao fluxo que deve ser utilizado na coleta de amostras clínicas para que seja quantificada a carga viral do vírus herpes 8 em pacientes com diagnóstico ou suspeita de Sarcoma de Kaposi (SK) atendidos no INI.

3. FUNDAMENTO DO MÉTODO

Uma vez que o INI possui um serviço de referência para o tratamento e acompanhamento de pacientes com SK e AIDS, a implementação da técnica de PCR em tempo real para quantificação da carga viral do HHV-8, se faz fundamental para a melhor compreensão da dinâmica desta patologia. Adicionalmente, esta técnica torna-se particularmente interessante para diagnóstico e acompanhamento das apresentações clínicas graves associadas



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 2/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

à infecção por este vírus.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

| | |
|-------|---|
| HHV-8 | Vírus herpes 8 |
| SK | Sarcoma de Kaposi |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida |

5. CONDIÇÕES GERAIS

A qualidade dos resultados dos exames laboratoriais está intimamente relacionada à fase pré-analítica, que se inicia desde o preenchimento correto da requisição, preparo do paciente, coleta e identificação da amostra, armazenamento temporário da amostra no local de coleta, transporte ao laboratório, até o recebimento e cadastramento das amostras na Plataforma Multiusuário. Esta fase deve ser criteriosamente definida e constantemente monitorada em razão do impacto significativo das atividades realizadas durante este processo sobre a qualidade do resultado liberado. O envio de amostras deve atender aos requisitos definidos a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC 20/2014) que regula as atividades de transporte de amostras clínicas do ponto de vista da vigilância sanitária e seguir as orientações do Manual de Vigilância Sanitária Sobre o Transporte De Material Biológico Humano para Fins de Diagnóstico Clínico – Anvisa/ 2015.

6. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- No momento da coleta de sangue, o profissional de saúde deverá utilizar equipamentos de proteção individual (EPI). Assim sendo, é imprescindível a utilização de avental ou jaleco, luvas descartáveis, óculos ou protetor facial.
- Higienização simples das mãos com água e sabão antes e após a coleta.
- Antissepsia do local que será puncionado utilizando gaze ou algodão.



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 3/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

embebidos em uma solução de álcool etílico a 70% peso/peso (p/p) ou outro antisséptico.

- O descarte do material (seringa, agulha, gaze), deve ser realizado em recipientes específicos.

7. MATERIAIS PARA COLETA COM SERINGA E AGULHA

- Garrote;
- Curativo adesivo;
- Escalpe descartável com dispositivo de segurança;
- Agulha descartável com dispositivo de segurança;
- Adaptador para agulha;
- Tubos a vácuo:
 - Um para coleta de soro: sem anticoagulante (tampa vermelha ou tubo SST com ativador de coágulo e gel separador);
 - Um para coleta de plasma: com EDTA (tampa roxa).

8. PROCEDIMENTOS PARA COLETA

Atenção: Não é necessário jejum para coleta.

- Retire a capa da agulha e imediatamente faça a punção com o bisel da agulha virado para cima;
- Insira o tubo no adaptador e pressione-o até perfurar a tampa do tubo;
- Quando o sangue começar a fluir solte o garrote e peça ao usuário que abra a mão;
- Troque o tubo quando o sangue parar de fluir para seu interior;
- Enquanto o tubo seguinte está sendo completado, homogeneíze o tubo anterior, invertendo-o suavemente entre 5 e 10 vezes;
- Coloque a amostra colhida em estante para tubos, de modo que fique na posição vertical;
- Repita o procedimento anterior, sucessivamente, até ter colhido todos os tubos necessários;
- Retire o último tubo;
- Remova a agulha da veia e solicite que o usuário faça pressão sobre o local da punção com o auxílio de uma gaze ou algodão seco;
- Acione imediatamente o dispositivo de segurança da agulha;



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 4/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

- k. Oriente o usuário para que mantenha o braço esticado e o local da punção pressionado, sem esfregar, por no mínimo três minutos;
- l. Descarte imediatamente a agulha em recipiente apropriado para materiais perfurocortantes, adotando todos os cuidados de biossegurança;
- m. Verifique se o local da punção parou de sangrar. Caso continue o sangramento troque o algodão ou a gaze e oriente para que o usuário continue pressionando o local da punção até parar o sangramento;
- n. Cubra o local da punção com curativo oclusivo e oriente ao usuário para mantê-lo por, no mínimo, 15 minutos;
- o. Retire as luvas e descarte em recipiente próprio;
- p. Quando o usuário estiver usando roupa de manga longa, verifique se a manga está prendendo a circulação e atuando como um garrote. Caso isto aconteça desdobre a manga;
- q. Oriente o usuário a não dobrar o braço e não carregar qualquer peso no braço no qual foi feita a punção por, no mínimo, uma hora;
- r. Certifique-se que o usuário está se sentindo bem e em condições de se locomover sozinho;
- s. Entregue a ele o comprovante de coleta;
- t. Identifique na requisição a data, o horário e o responsável pela coleta;
- u. Encaminhe as amostras o mais rápido possível para o setor de processamento de amostras.

9. PROCEDIMENTOS PARA PROCESSAMENTO

Para obter o plasma você deverá utilizar um tubo contendo EDTA (tampa roxa). Homogeneize a amostra por inversão, entre 5 e 10 vezes, centrifugue por 10 minutos entre 2.500 e 3.500 rpm. O plasma é a parte líquida amarela que fica na parte superior do tubo.

Para obter soro, você deverá utilizar um tubo sem anticoagulante (tampa vermelha ou SST com ativador de coágulo e gel separador). Deixe em temperatura ambiente, em repouso, até a total retração do coágulo. Centrifugue por 10 minutos entre 2.500 a 3.500 rpm. A centrifugação deve ocorrer dentro de, no máximo, 2 horas após a coleta. O soro é a parte líquida superior amarela que fica na parte superior do tubo.

Guarde os respectivos sobrenadantes em eppendorfs e congele à -80°C.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 5/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

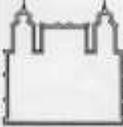
Resolução da Diretoria Colegiada (RDC 20/2014).
Manual de Vigilância Sanitária Sobre o Transporte De Material Biológico Humano para Fins de Diagnóstico Clínico – Anvisa/ 2015.
Técnicas para Coleta de Sangue e Coleta de Sangue - Diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e Hepatites Virais – Ministério da Saúde/TELELAB.

11. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Primeira versão do documento.

12. ANEXOS

Anexo 1 – Pedido de exame médico
Anexo 2 – Fluxograma para indicação de coleta

| | |
|---|--|
|  | Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz / INI Plataforma Multusuário Av. Brasil, 4365 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil |
|---|--|

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 6/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

TÍTULO
FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI.

ANEXO 1

| | |
|---------------------|-------|
| Nome Completo: | |
| Data de Nascimento: | Sexo: |
| Nº do Prontuário: | |

Critérios de inclusão para análise:

| | | | |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | Febre | <input type="checkbox"/> | Anemia |
| <input type="checkbox"/> | Fadiga | <input type="checkbox"/> | Trombocitopenia |
| <input type="checkbox"/> | Edema | <input type="checkbox"/> | Hipoalbuminemia |
| <input type="checkbox"/> | Caquexia | <input type="checkbox"/> | Hiponatremia |
| <input type="checkbox"/> | Sintomas Resp. | <input type="checkbox"/> | PCR > 0,3 (elevado) |
| <input type="checkbox"/> | Sintomas TGI | <input type="checkbox"/> | Hepato/esplenomegalia |
| <input type="checkbox"/> | Linfadenopatia | <input type="checkbox"/> | Derrames cavitários |
| <input type="checkbox"/> | Artralgia/ Mialgia | | |
| <input type="checkbox"/> | Alteração do sensório | | |
| <input type="checkbox"/> | Neuropatia com/sem dor | | |

| | |
|---|--|
| Data e hora da coleta | |
| Responsável pela coleta | |
| Data e hora recebimento no laboratório | |
| Responsável pelo recebimento no laboratório | |

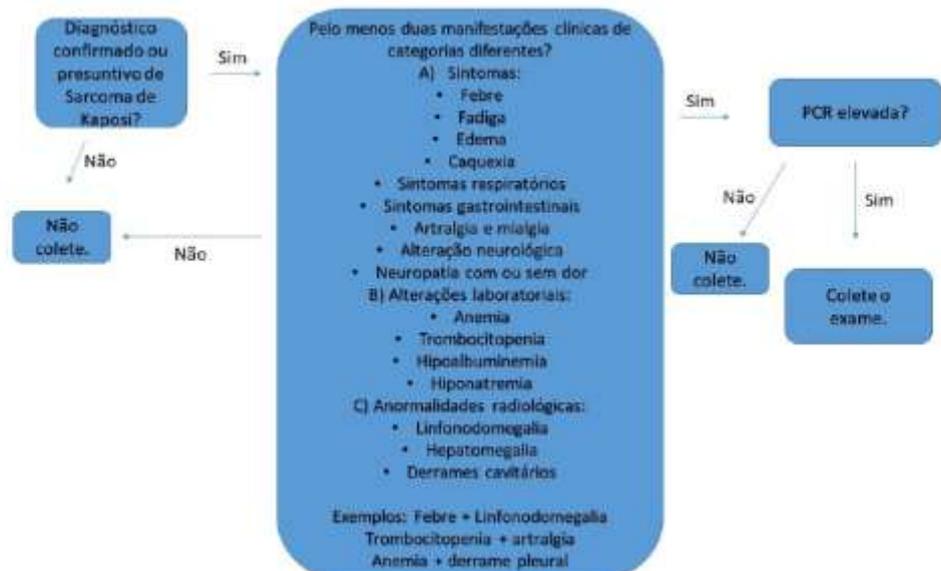
 Médico/ CRM



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 7/7 | CÓDIGO POP-001 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

TÍTULO
FLUXO PARA COLETA DE AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI.

ANEXO 2



APÊNDICE B – EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO “HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID” DA ROCHE.



| | | | |
|---------------------------------------|---------|--------|---------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO | PÁGINA | CÓDIGO |
| | 00 | 1/7 | POP-002 |

| |
|---|
| TÍTULO EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO “HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID” DA ROCHE. |
|---|

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Fundamento do Método*
4. *Siglas*
5. *Condições Gerais*
6. *Condições de Biossegurança*
7. *Equipamentos*
8. *Material/Reagentes*
9. *Metodologias/Procedimentos*
10. *Referências Bibliográficas*
11. *Histórico da Última Revisão*
12. *Anexos*
Anexo 1 - Preparo das soluções do Kit e suas condições de armazenamento

1. OBJETIVO

Este documento tem como objetivo padronizar e estabelecer as condições necessárias para extração de DNA viral do HHV-8 utilizando o kit *High Pure Viral Nucleic Acid* da Roche.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se à extração de DNA viral de amostras clínicas de plasma EDTA e soro de pacientes com diagnóstico ou suspeita de Sarcoma de Kaposi atendidos no INI.

3. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O isolamento do DNA viral da amostra é pré-requisito para realização da técnica de PCR em tempo real. Dessa forma, a amostra primeiramente será lisada durante a incubação em um tampão especial que contém proteinase K. Posteriormente, o DNA viral se ligará às fibras de vidro na presença de um sal caotrópico e após as etapas de lavagens, é possível extrair o DNA viral.

4. SIGLAS



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 2/7 | CÓDIGO POP-002 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO "HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID" DA ROCHE. |
|---|

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| PA | Para análise |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| Poly(A) | Carreador de RNA Poly(A) |
| Solução de trabalho | Poly(A) + tampão de ligação |
| UV | Ultravioleta |

5. CONDIÇÕES GERAIS

Todos os procedimentos deverão ser realizados na sala de extração para evitar a contaminação de ácidos nucleicos e nucleases. É necessário incluir um controle negativo (amostra sabidamente sem o DNA investigado) e um controle positivo a cada extração realizada. A manipulação deve ser cuidadosa para evitar a possível contaminação cruzada entre as amostras e/ou entre amostras e controle positivo, através da formação de aerossóis. A fonte mais abundante de contaminação por nucleases exógenas vem das mãos, pele, cabelo ou superfícies de laboratório contaminadas, portanto, os seguintes critérios devem ser observados:

- O uso de jaleco, máscara, touca e luvas em todas as etapas de manipulação das amostras, dos plásticos e reagentes a serem utilizados;
- O uso de gaze embebida em hipoclorito a 5% para limpar as luvas a cada manipulação de amostra ou controle;
- Os consumíveis (ponteiras e tubos) não devem ser reutilizados;
- Os reagentes utilizados na extração devem ser preparados com água livre de nucleases, obtida comercialmente, ou alternativamente, água tipo 1 coletada em frascos de vidro tratados por 180°C/4 h.

Antes da realização do ensaio, os seguintes cuidados devem ser tomados:

- As bancadas devem ser descontaminadas com hipoclorito a 5%, ou peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos, ou ácido clorídrico (HCl) 1N por 1 hora. Após a incubação, lavar a superfície com água livre de RNases ou álcool 70%;
- O interior das cabines de segurança biológica deve ser descontaminado



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 3/7 | CÓDIGO POP-002 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO "HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID" DA ROCHE. |
|---|

com hipoclorito a 5%, álcool 70% e UV por 10 minutos;

- Os pipetadores devem ser descontaminados com hipoclorito a 5% e álcool 70%.

Após a realização do procedimento, os seguintes cuidados devem ser tomados:

- Os pipetadores devem ser descontaminados com hipoclorito a 5% e álcool 70%;
- As bancadas devem ser descontaminadas com hipoclorito a 5% e álcool 70%;
- O interior das cabines de segurança biológica deve ser descontaminado com hipoclorito a 5%, álcool 70% e UV por 20 minutos.

6. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

- O ensaio deve ser realizado utilizando jaleco, luvas, máscara e touca.
- O descarte dos tampões, álcool e guanidina, devem ser realizados em recipientes específicos, previamente identificados, para posterior descarte como lixo químico;
- O descarte dos consumíveis utilizados no ensaio deve ser feito em recipiente com saco de biossegurança para posterior autoclavação.
- O sal caotrópico do tampão é irritante, portanto, o uso de luvas é indispensável.
- Não utilize etanol modificado.

7. EQUIPAMENTOS

- Micropipetas para os volumes de 200 µL e 1000 µL;
- Cabine de segurança biológica com luz UV;
- Microcentrifuga para tubos de 1,5 mL;
- Freezer -80°C.

8. MATERIAL/REAGENTES



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 4/7 | CÓDIGO POP-002 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO "HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID" DA ROCHE. |
|---|

- Ponteiros estéreis, para os volumes de 200 µL e 1000 µL, livres de nucleases e pirogênio com filtro;
- Tubos de 1,5 mL livres de nucleases e pirogênio;
- Recipientes para descarte de ponteiros, etanol e guanidina devidamente separados e identificados;
- Luvas sem talco;
- Jaleco;
- Máscara;
- Touca;
- Gaze embebida com hipoclorito a 5%;
- Papel absorvente;
- Caneta de ponta fina com tinta resistente a água para identificação dos tubos;
- Estante para tubos;
- Etanol absoluto PA;
- Água livre de nucleases ou, alternativamente, água do tipo 1;
- *Kit de extração High Pure Viral Nucleic Acid*
 - Proteinase K;
 - Carreador de RNA Poly(A);
 - Tampão de ligação;
 - Tampão de remoção de inibidor;
 - Tampão de lavagem;
 - Tampão de eluição;
 - Tubos de filtração;
 - Tubos de coleta.

9. METODOLOGIAS/PROCEDIMENTOS

Atenção: Sempre utilize jaleco, máscara, touca e luvas.

Antes de manipular uma amostra diferente, limpe as luvas em gaze embebida com hipoclorito a 5%.

- a. Em um tubo de 1,5 mL livre de nucleases e pirogênios coloque 200 µL de plasma EDTA ou soro, 200 µL da solução de trabalho suplementada com poly(A) e 50 µL de Proteinase K;



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 5/7 | CÓDIGO POP-002 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO "HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID" DA ROCHE. |
|---|

- b. Misture e incube por 10 minutos à 72°C.
- c. Acrescente 100 µL do tampão de ligação e misture.
- d. Transfira a amostra para o tubo de filtração. Para isso, insira um tubo de filtração em um tubo de coleta e pipete a amostra inteira no reservatório na parte superior do filtro. Certifique-se de distribuir todo o volume de forma homogênea sobre a superfície do filtro.
- e. Centrifugue por 1 minuto à 8000 x g.
- f. Remova o tubo de filtração do tubo de coleta, descarte o sobrenadante e o tubo de coleta e encaixe o tubo de filtração a um novo tubo de coleta.
- g. Adicione 500 µL do tampão de remoção do inibidor e centrifugue por 1 minuto à 8000 x g.
- h. Remova o tubo de filtração do tubo de coleta, descarte o sobrenadante e o tubo de coleta e encaixe o tubo de filtração a um novo tubo de coleta.
- i. Adicione 450 µL do tampão de lavagem e centrifugue por 1 minuto à 8000 x g.
- j. Descarte o sobrenadante.
- k. Remova o tubo de filtração do tubo de coleta, descarte o sobrenadante e o tubo de coleta e encaixe o tubo de filtração a um novo tubo de coleta.
- l. Adicione 450 µL do tampão de lavagem e centrifugue por 1 minuto à 8000 x g.
- m. Descarte o sobrenadante.
- n. Centrifugue novamente na velocidade máxima (aproximadamente 13000 x g) por 10 segundos.

Obs.: A centrifugação extra garante a eliminação de resíduos do tampão de lavagem.

- h. Descarte o tubo de coleta e insira o tubo de filtração em um tubo de 1,5 mL livre de nucleases e pirogênicos.
- o. Adicione 50 µL do tampão de eluição e centrifugue por 1 minuto à 8000 x g.
- h. Após essa etapa temos o DNA eluído. Utilize o DNA eluído diretamente para realizar o PCR ou armazene à -80°C.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bula do fabricante.



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 6/7 | CÓDIGO POP-002 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

TÍTULO
EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO "HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID" DA ROCHE.

11. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Primeira versão do documento.

12. ANEXOS

Anexo 1 - Preparo das soluções do Kit e suas condições de armazenamento



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 7/7 | CÓDIGO POP-002 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO EXTRAÇÃO DE DNA COM KIT DE EXTRAÇÃO "HIGH PURE VIRAL NUCLEIC ACID" DA ROCHE. |
|---|

ANEXO 1

Preparo das soluções do *kit* (antes de usar pela primeira vez) e suas condições de armazenamento.

Atenção! Sempre coloque a data de abertura dos tampões utilizados e do *kit*.

- 1) **Proteinase K**
Dissolva a proteinase K em 5 mL do tampão de eluição e misture.
Aliquotas devem ser armazenadas de -15 a -25 °C.
Estável por 12 meses.
- 2) **Carreador de RNA Poly(A)**
Dissolva Poly(A) em 0,5 mL do tampão de eluição e misture.
Prepare 50 alíquotas.
Aliquotas devem ser armazenadas de -15 a -25 °C.
- 3) **Solução de trabalho**
Misture 50 µL da Poly(A) com 2,5 mL do tampão de ligação.

Obs.: Sempre prepare a solução de trabalho antes do uso. Não armazene!
- 4) **Tampão de remoção de inibidor**
Adicione 20 mL de etanol absoluto ao tampão de remoção do inibidor e misture bem.
Aliquotas devem ser armazenadas de +15 a +25 °C.
A validade será a mesma descrita na etiqueta do *Kit*.
- 5) **Tampão de lavagem**
Adicione 40 mL de etanol absoluto ao tampão de lavagem e misture bem.
Aliquotas devem ser armazenadas de +15 a +25 °C.
A validade será a mesma descrita na etiqueta do *Kit*.

APÊNDICE C – REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI.



| | | | |
|---------------------------------------|---------|--------|---------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO | PÁGINA | CÓDIGO |
| | 00 | 1/6 | POP-003 |

| |
|---|
| TÍTULO REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Siglas*
4. *Condições Gerais*
5. *Condições de Biossegurança*
6. *Equipamentos*
7. *Material/Reagentes*
8. *Metodologias/Procedimentos*
9. *Referências Bibliográficas*
10. *Histórico da Última Revisão*
11. *Anexos*
 - Anexo 1: Modelo de placa
 - Anexo 2: Sequências nucleotídicas

1. OBJETIVO

Este documento descreve os procedimentos necessários para a realização da reação da qPCR utilizadas para a detecção do vírus HHV-8 em amostras clínicas de plasma (EDTA) e soro.

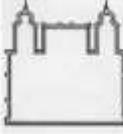
2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se à reação da qPCR para a detecção do vírus HHV-8 em amostras clínicas (plasma e soro) suspeitas de pacientes infectados pelo HIV atendidos no INI.

3. SIGLAS

É usada no texto deste POP a seguinte sigla:

| | |
|------|--|
| qPCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
|------|--|

| | |
|---|--|
|  | Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz / IOC-INI-CDTS Laboratório de Virologia Molecular Av. Brasil 4365 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil |
|---|--|

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 2/6 | CÓDIGO POP-003 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

4. CONDIÇÕES GERAIS

Cuidados especiais devem ser tomados para evitar contaminação cruzada através de aerossóis gerados durante a manipulação;
 Todos os procedimentos devem ser realizados nas salas específicas a fim de evitar a contaminação com produtos já amplificados. As misturas devem ser preparadas na sala limpa e o DNA deve ser adicionado à mistura para qPCR na sala de extração;
 Todos os plásticos utilizados devem ser novos, livres de RNase, DNase e pirogênio. As ponteiros devem, além destas características, necessariamente conter barreira de proteção;

Antes da realização dos ensaios, os seguintes cuidados devem ser tomados:

- As bancadas devem ser descontaminadas com hipoclorito a 5% e álcool 70%. Após a incubação limpar a superfície com álcool 70%;
- O interior das cabines de segurança biológica deve ser descontaminado com hipoclorito a 5%, álcool 70% e UV por 15 minutos.

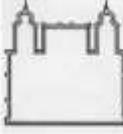
Após a realização dos procedimentos, os seguintes cuidados devem ser tomados:

- Os pipetadores devem ser descontaminados com hipoclorito a 5% e álcool 70%;
- As bancadas devem ser descontaminadas com hipoclorito a 5% e álcool 70%;
- O interior das cabines de segurança biológica deve ser descontaminado com hipoclorito a 5%, álcool 70% e UV por 15 minutos;

5. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

O ensaio deve ser realizado utilizando jaleco (restrito a cada sala), touca e luvas de nitrila;

O descarte das ponteiros e luvas deve ser realizado nos recipientes designados nas respectivas salas como material contaminado, para posterior autoclavagem;

| | |
|---|--|
|  | Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz / IOC-INI-CDTS Laboratório de Virologia Molecular Av. Brasil 4365 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil |
|---|--|

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 3/6 | CÓDIGO POP-003 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

6. EQUIPAMENTOS

- Pipetadores automáticos de 2µL, 10µL, 100µL, 200 µL e 1000 µL;
- Cabine workstation;
- Centrífuga de tubos;
- Centrífuga de placas;
- Aparelho de PCR em tempo real.

7. MATERIAL/REAGENTES

- Tubo de 1,5 mL e 2 mL para preparação das misturas;
- Ponteiras livres de nucleases e pirogênio com filtro;
- Estante para tubos;
- Recipientes para descarte de ponteiras e resíduos;
- Luvas de nitrila;
- Gaze ou papel absorvente;
- Caneta com tinta resistente à água para identificação dos tubos;
- Iniciadores diretos (reconstituído em uma solução 20 µM);
- Iniciadores reversos (reconstituído em uma solução 20 µM);
- Sonda Taqman® fluorogênica (em uma solução 5 µM);
- Plasmídeo (pMCP-1) contendo inserto para HHV-8 (nt 47239 a 47554)
- *Kit de extração High Pure Viral Nucleic Acid*;
- *Master mix TaqMan Universal Master Mix II with UNG*;
- Água livre de nucleases;
- Placa óptica;
- Adesivo óptico;
- Suporte para placas.

8. METODOLOGIAS/PROCEDIMENTOS

8.1 . Extração do DNA (sala extração)

Extraia o DNA viral utilizando o *Kit de extração High Pure Viral Nucleic Acid* (POP-001).



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 4/6 | CÓDIGO POP-003 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

8.2. Preparo do Master Mix (sala de mix)

- a. Na **sala limpa**, adicione todos os reagentes do Master mix em um tubo de 1,5 mL ou 2 mL como descrito abaixo;

| | |
|--|---------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix 2x | 25 µL |
| Primer direto 20 µM..... | 0,75 µL |
| Primer reverso 20 µM..... | 2,25 µL |
| Sonda 5 µM..... | 2 µL |
| Água livre de RNases | 10 µL |
| DNA | 10 µL |

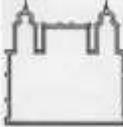
Nota 1: Manter o mix refrigerado e protegido da luz até a sua utilização.

Atenção! Volume suficiente para uma amostra. Os pacientes serão avaliados em duplicata enquanto a curva construída por meio do plasmídeo será avaliada em triplicata. Dessa forma, para obter o volume total de reação, multiplique os volumes de cada reagente pelo número de amostras x 2 + o número de pontos da curva x 3. É recomendável que a curva varie na faixa de 10^0 - 10^6 cópias genômicas.

- b. Distribua 40 µL em cada poço da placa óptica;
c. Na **sala da extração**, adicione 10 µL do DNA extraído da amostra clínica aos 40 µL da mistura do Master Mix na placa, perfazendo um volume total de 50 µL;
d. Fazer sempre em duplicata;
e. Sele a placa com o adesivo óptico com o auxílio de uma espátula seladora, nunca utilize os dedos pois a leitura da reação pode ser prejudicada;
f. Transporte a placa para a sala de PCR e centrifugue brevemente a placa selada, a fim de eliminar bolhas e reunir os reagentes no fundo dos poços;
g. Adicione a placa no aparelho de PCR em tempo real e execute o programa "QuantStudio Real Time PCR Software": 95°C/12 min, 95°C/15 s e 60°C/60 s durante um total de 50 ciclos.

Obs. 1: Caso não a placa não seja imediatamente utilizada conserve em geladeira.

Obs. 2: O controle de qualidade é realizado em cada placa utilizando água livre de nuclease.

| | |
|---|--|
|  | Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz / IOC-INI-CDTS Laboratório de Virologia Molecular Av. Brasil 4365 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil |
|---|--|

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 5/6 | CÓDIGO POP-003 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

| |
|---|
| TÍTULO REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI. |
|---|

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

POP-001. Extração de DNA com *Kit de extração High Pure Viral Nucleic Acid; Bula Kit master mix TaqMan Universal Master Mix II, with UNG*.
 WHITE, I. E.; CAMPBELL, T. B. Quantitation of cell-free and cell-associated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1992–1995, maio 2000.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Primeira revisão do documento.

11. ANEXOS

Anexo 1: *Modelo placa*
 Anexo 2: *Sequências nucleotídicas*



| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 6/6 | CÓDIGO POP-003 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

TÍTULO
REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI.

ANEXO 1

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|----|----|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 10 ⁸ | 10 ⁸ | 10 ⁸ | P1 | P1 | | | | | | | |
| B | 10 ⁷ | 10 ⁷ | 10 ⁷ | P2 | P2 | | | | | | | |
| C | 10 ⁶ | 10 ⁶ | 10 ⁶ | P3 | P3 | | | | | | | |
| D | 10 ⁵ | 10 ⁵ | 10 ⁵ | P4 | P4 | | | | | | | |
| E | 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ⁴ | | | | | | | | | |
| F | 10 ³ | 10 ³ | 10 ³ | | | | | | | | | |
| G | 10 ² | 10 ² | 10 ² | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

↓ Controle de PCR
↓ Controle extração

| | |
|---|--|
|  | Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz / IOC-INI-CDTS Laboratório de Virologia Molecular Av. Brasil 4365 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil |
|---|--|

| | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|
| POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO | REVISÃO 00 | PÁGINA 7/6 | CÓDIGO POP-003 |
|---------------------------------------|---------------|---------------|-------------------|

TÍTULO
REAÇÃO qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HHV-8 EM PLASMA E SORO EM PACIENTES ATENDIDOS NO INI.

ANEXO 2

| HHV-8 | | Sequência (5'→3') |
|---------------|-----------|----------------------|
| <i>Primer</i> | Senso | CTCGAATCCAACGGATTGAC |
| | Antisenso | TGCTGCAGAATAGCGTGCC |
| <i>Sonda</i> | | CCATGGTCGTGCCGCAGCA |