



## 6. PRODUTO TÉCNICO-TECNOLÓGICO

 <b>INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-UFPA</b> <b>LABORATÓRIO DE VIROLOGIA -LABVIR</b> <b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b>		<b>POP LABVIR 1.5 - 001</b>
		Revisão: <b>00</b>
		Página 1 de 13
		Data efetiva: <b>00/00/0000</b>

### **PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02***

<b>Aprovado por:</b> XXXXXXXX	Comissão de Gestão da Qualidade	00/00/0000
<b>Liberado por:</b> XXXXXXXX	Função	00/00/0000
<b>Verificado por:</b> Jacqueline Cortinhas Monteiro	Função: Professora Adjunta	03/02/2022
<b>Elaborado por:</b> Rosian Silva	Função: Discente PPGAC	21/01/2022

## Sumário

### 1 Objetivo

### 2 Campo de aplicação

### 3 Definições

### 4 Siglas

### 5 Responsabilidades

### 6 Procedimentos

### 7 Referências

### 8 Documentos complementares

### 9 Histórico do documento



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

### 1 Objetivo

Estabelecer as condições e procedimentos para detecção molecular dos vírus pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirus* (HHV-1 e HHV-2) em amostras cérvico-uterinas através da técnica de PCR duplex, após as etapas de extração do DNA.

### 2 Campo de aplicação

Este procedimento se aplica ao diagnóstico molecular de infecções pelo HHV-1 e/ou HHV-2 em amostras endocervicais, através da técnica PCR duplex.

### 3 Definições

Para efeito deste POP aplicam-se as seguintes definições:

**Amostra cérvico-uterina:** amostra biológica de origem humana coletada a partir de células de descamação da endocérvice e ectocérvice uterina.

**Ácido desoxirribonucleico (DNA):** material genético que contém as informações do vírus;

**Eletroforese:** método muito utilizado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA;

**TAE:** solução tampão utilizada na eletroforese cuja função é manter o pH do meio estável durante o processo.

**Mix:** solução contendo quantidades pré-definidas dos reagentes de PCR, a exceção da DNA polimerase.



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

### 4 Siglas

- LABVIR:** Laboratório de Virologia;  
**EPC:** Equipamento de Proteção Coletiva;  
**EPI:** Equipamentos de Proteção Individual;  
**HHV:** *Herpesvírus humano*;  
**TaqDNA:** Enzima termoestável de *Thermus aquaticus*;  
**CN:** controle negativo;  
**CP:** Controle positivo;  
**POP:** Procedimento Operacional Padrão;  
**UV:** Ultravioleta;  
**PCR:** Reação em Cadeia mediada pela Polimerase;  
**FO:** Formulário;  
**CSB:** Cabine de Segurança Biológica;  
**µM:** micromolar;  
**pmol:** picomolar  
**mL:** mililitro  
**dNTP:** Desoxirribonucleotídeos Fosfatados  
**Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:** Cloreto de magnésio  
**TAE:** tampão Tris-Acetato-EDTA

### 5 Responsabilidades

A execução do teste de PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02* é de responsabilidade de todos os servidores e alunos de pós-graduação do LABVIR envolvidos na rede de infecções sexualmente transmissíveis.

Os alunos de graduação com vínculo de estagiário podem, eventualmente, realizar a análise das amostras desde que tenham sido treinados e sejam assistidos por um servidor ou aluno de pós-graduação.

#### 5.1 Chefes do laboratório, serviços e setores ou seus substitutos.



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

Ao chefe/coordenador do LABVIR compete a supervisão dos envolvidos na execução do teste, bem como emissão dos laudos ou resultados obtidos. Na ausência do coordenador do Laboratório, outro professor poderá ser indicado como substituto.

### 5.2 Responsável Técnico e/ou seu substituto.

Ao responsável técnico (RT) e/ou substituto do LABVIR compete a supervisão dos processos, bem como emissão dos laudos ou resultados obtidos. Na ausência do RT, outro professor poderá ser indicado como substituto.

### 5.3 Gerente da qualidade e/ou seu substituto.

Ao núcleo de gestão da qualidade do LABVIR compete a revisão e atualização deste documento de forma periódica ou sempre que houver necessidade.

## 6 Procedimentos

### 6.1 Método

A técnica de PCR duplex apresenta, basicamente, o princípio da amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA, em uma mesma amostra, gerando grande quantidade dessa região de interesse e permitindo que ela seja analisada (RAMOS, 2012; PARENTE, 2019). Este protocolo de detecção molecular dos herpesvírus utiliza um conjunto de *primers* específicos para uma região alvo do HHV-1 e HHV-2, com tamanho de amplicon de 143 pb e 226 pb, respectivamente (PARENTE, 2019). Este ensaio se desenvolve em 3 etapas. A primeira etapa do ensaio consiste na desnaturação do DNA, onde ocorre a separação das fitas moldes de DNA, através da elevação da temperatura. Durante a segunda etapa, anelamento, os iniciadores ligam-se especificamente na região alvo. Na terceira fase ocorre a extensão da fita, a partir da adição de nucleotídeos e ação da Taq DNA polimerase (RAMOS, 2012). Para cada etapa, existe uma temperatura ótima e tempo ideal para que a reação aconteça. As condições de amplificação desta PCR são: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C a 30 segundos, 60°C a 20



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

segundos, 72°C a 30 segundos com extensão final de 8 minutos a 72°C. Ao final do processo, os produtos gerados serão separados e visualizados através da técnica de eletroforese, para emissão dos resultados (PARENTE, 2019).

### 6.2 Amostra

Este ensaio foi desenvolvido para detecção dos herpesvírus a partir de amostras cérvico-uterinas coletadas nas unidades de saúde, ações sociais ou afins. Após a coleta, o material deve ser armazenados em caixa térmica para seu transporte até o laboratório.

A amostra deve ser registrada e processada de acordo com o POP LABVIR 1.1 001 (RECEBIMENTO, REGISTRO E IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA BIOLÓGICA) e submetida a processo de extração de ácido nucleico conforme os protocolos disponíveis (Vide POP LABVIR 1.2 e 1.3 001) e armazenadas no freezer (-20°C), caso necessário.

### 6.3 Material e equipamentos

#### Para PCR

EPI's  
Microtubos;  
Estantes para microtubos;  
Micropipetas de volumes variáveis;  
CSB;  
Termociclador;  
Freezer.

#### Para eletroforese

EPI's;  
Micropipetas de volumes variáveis;  
Placa para microtitulação;  
Balança;  
Becker;



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

Microondas;

Fonte e Cuba para eletroforese;

### 6.4 Soluções e reagentes

#### Para PCR

Água pura;

Tampão de PCR;

Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>;

Primers;

dNTP;

TaqDNA polimerase;

DNA.

#### Para eletroforese

Gel de Agarose;

TAE 1X;

Brometo de Etídio.

### 6.5 Cuidados operacionais

- Utilizar equipamento de proteção individual (EPI), tais como: luva descartável e jaleco em todas as etapas do teste e máscara e touca, principalmente ao manipular amostras fora da CSB.
- Ligar a cabine, limpá-la com solução de álcool desinfetante;
- Organizar a CSB com as pipetas, ponteiras, recipiente para descarte, suporte, tubos de 0,2 µL e 2 mL e ligar a luz UV por, no mínimo, 15 minutos.
- Retirar os reagentes, água, *primers* e as amostras (quando congeladas) do congelador com 30 minutos de antecedência.
- Montar o template do teste utilizando o Formulário "FORLABVIR 07". Sendo obrigatório a utilização de controle negativo em cada reação.

#### Atenção:

- 1) Cuidado para não expor os reagentes à radiação UV.



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

2) A aplicação do DNA das amostras deve ser realizada **fora** da CSB.

- Avaliar o funcionamento do termociclador e verificar se as condições de amplificação estão adequadas.

### 6.6 Descrição

#### 6.6.1 Preparo da solução de estoque e trabalho dos Primers

Ao utilizar os primers pela primeira vez, proceder com a eluição em água ou tampão de acordo com as recomendações do fabricante. No LABVIR, as soluções estoque de Primer devem ser preparadas a uma concentração de 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  ou 100  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ , a partir da qual será preparada a solução “uso” para PCR, nas concentrações indicadas na Tabela 1.

Tabela 1- Concentração das soluções estoque e de trabalho de iniciadores para herpesvírus

Primer	Sequência	Solução estoque ( $\mu\text{M}/\text{mL}$ )	Solução de trabalho ( $\text{pmol}/\mu\text{L}$ )
H1P32	5'-TGGGACACATGCCTTCTTGG-3'	100	10
H1M32	5'-ACCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTACCC-3'	100	10
H2P4	5'-GTACAGACCTTCGGAGG-3'	100	10
H2P40	5'-CGCTTCATCATGGGC-3'	100	10

Calcular a diluição da solução a partir da fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

$C_i$ = Concentração inicial

$V_i$ = Volume inicial

$C_f$ = Concentração final

$V_f$ = Volume final

Adicionar a quantidade de água necessária e homogeneizar bem.

**Nota:** a solução estoque e a solução de trabalho devem ser armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

### Preparo do dNTP

No LABVIR, cada nucleotídeo está em uma concentração de 100mM. A partir da qual será preparada a solução “uso” para PCR, nas concentrações indicadas na Tabela 2.

Tabela- 2 Concentração de nucleotídeos soluções estoque e de trabalho

Nucleotídeo	Solução estoque [mM/ µL]	Solução de trabalho [mM/µL]
dATP	100	10
dCTP	100	10
dGTP	100	10
dTTP	100	10

### 6.6.2 Preparo do Mix

É importante que antes de preparar o “mix”, o *template* do teste esteja montado de acordo com o número de amostras a serem processadas, incluindo os controles da reação, utilizando o formulário específico do laboratório (“FORLABVIR 07”; Anexo 1); calculando as quantidades necessárias de cada reagente;

Lembre-se de retirar os reagentes {água pura, tampão de PCR (10X), Mg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mM), primer HHV-1 F (10pmol), HHV-1 R (10pmol), Primer HHV-2 F (10pmol), Primer HHV-2 R, dNTP (10mM) e as amostras (quando congeladas)} do congelador antes de iniciar este procedimento e; de Identificar os tubos ou a placa PCR.

**Atenção:** Retirar a *TaqDNA* da geladeira somente no momento de usá-la.

### Preparar a solução Mix:

A reação de PCR duplex foi padronizada e otimizada em um volume final de 25µL contendo 14,5 µL de água, 2,5 µL de tampão PCR (10X), 0,7 de cloreto de



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

magnésio ( $Mg_2Cl_2$ ), 0,5  $\mu L$  de cada iniciador, 1  $\mu L$  de dNTPs, 0,3  $\mu L$  de *Taq* DNA Polimerase e 4  $\mu L$  de DNA para cada amostra.

Na CSB, em um microtubo de 2mL estéril, adicionar as quantidades equivalentes de água para PCR, tampão PCR (10x),  $Mg_2Cl_2$  (50mM), primers, dNTP e *Taq*DNA, conforme descrito na Tabela 03.

Tabela 3- Preparo do Mix para PCR para 01 amostra

Reagentes	Volume ( $\mu L$ )	
	Quantidade para 01 reação	Multiplicar o volume pelo número de amostras a serem testadas
Água	14,5	
Tampão PCR (1X)	2,5	
$Mg_2Cl_2$ (50 mM)	0,7	
Primer H1P32 (10pmol)	0,5	
Primer H1M32 (10pmol)	0,5	
Primer H2P4 (10pmol)	0,5	
Primer H2M40 (10pmol)	0,5	
dNTPs (10mM)	1,0	
<i>Taq</i> DNA polimerase	0,3	
DNA	4,0	
<b>Volume final</b>	<b>25 <math>\mu L</math></b>	

Na CSB, transferir 21  $\mu L$  de Mix para cada microtubo de 0,2  $\mu L$  devidamente identificado conforme o mapa de trabalho.

Fora da CSB, adicionar 4  $\mu L$  do controle positivo, do DNA extraído das amostras nos tubos correspondentes conforme a sequência identificada nos tubos.

**Nota 1:** Distribuir as amostras nos microtubos com cuidado, observando a sequência do mapa, para não ocorrer troca de tubos e contaminação;

**Nota 2:** O microtubo com o CN não deve ser aberto fora da CSB, para evitar contaminação;

**Nota 3:** Observar se não há formação de bolha nos microtubos.

Agitar o microtubo antes de colocá-lo no termociclador.



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

### 6.6.3 Montagem no Termociclador (Vide “ IT LABVIR 03”)

- a) Ligar o termociclador na tomada de 220v;
- b) Na parte posterior do termociclador mova o botão liga/desliga na posição liga. Aguardar até aparecer o menu principal.
- c) Colocar os tubos de PCR dentro dos poços do termociclador
- d) Revisar se as condições de amplificação estão de acordo com a técnica padronizada Deve selecionar no menu principal a função “*Edit*”, pressione a tecla [Enter] para confirmar.
- e) Selecionar o teste “*HHV*”; pressionar [Enter]
- c) Revisar as informações de cada item. Para modificar algum item, pressionar [Cancel] para limpar o valor e somente depois inserir o novo valor, depois pressionar [Enter]
- d) Na última janela, selecionar “YES” se for realizada alguma modificação e deseja salvar as alterações ou selecionar “no” para manter as informações do teste selecionado
- e) No menu principal selecionar “*Run*”, procurar o teste “*HHV*” e depois pressione a tecla [Enter] para iniciar a ciclagem no termociclador.

### 6.6.4 Visualização dos produtos da PCR duplex por eletroforese

Os produtos da PCR serão visualizados em gel de agarose a 2% através de eletroforese horizontal com tampão TAE 1x por 45 minutos, numa potência de 100V, mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta. Os resultados deverão ser registrados no sistema de fotodocumentação (Major Science).

**Preparar o gel de Agarose a 2% (Vide “POP LBAVIR 1.4 001”):** para 50 mL de gel, primeiro pesar 1,0g de agarose e depois adicionar 50mL de TAE 1X homogeneizar levemente. Levar ao microondas até homegeneizar. Deixar esfriar um pouco.

- a) Preparar o suporte o gel;

## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

**Nota:** Colocar o pente da espessura desejada no suporte, observando se o pente escolhido está acordo com o número e o volume das amostras para escolher o mais adequado.

- b) Despejar a solução de gel no suporte cuidadosamente para evitar fazer bolhas  
Esperar a solução solidificar;
- c) Colocar o suporte com o gel na cuba de eletroforese. Adicionar tampão TAE 1X até cobrir a superfície do gel;
- d) Extrair 10 µL da PCR e despejar no poço da placa de microtitulação;
- e) Homogeneizar com a pipeta 5 µL de azul de bromofenol e retirar 10 µL dessa homogeneização;
- f) Aplicar as amostras, peso molecular, controle negativo e controle positivo nos poços
- g) Ajustar numa potência de 100V por 45 minutos;
- h) Colocar o gel na solução de brometo de Etídio por 20 minutos;
- i) Analisar o gel sob radiação UV;
- j) Analisar se houve amplificação de banda nas amostras e nos controles comparando com o peso molecular;
- k) Realizar a fotodocumentação dos resultados obtidos.

### 7 Histórico do documento

**Quadro 01:** Quadro resumo contendo o histórico do POP.

REVISÃO	DATA	HISTÓRICO	RESPONSÁVEL
00	21/01/2022	Elaboração	Rosian Silva
01	03/02/2022	Verificação	Luiz Fernando Machado



## PCR duplex para diagnóstico da infecção genital pelos *Herpesvírus humano 01 e 02*

### 8 Referências

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 302, de 13 de outubro de 2005. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425/RDC\\_222\\_2018\\_.pdf/7038e853-afae-4729-948b-ef6eb3931b19](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3427425/RDC_222_2018_.pdf/7038e853-afae-4729-948b-ef6eb3931b19). Data de acesso: 12 de julho de 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração**, Rio de Janeiro, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT ISO/TR 10013. Diretrizes para documentação de sistema de gestão da qualidade**, Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Diretivas ABNT, parte 2. Regras para a estrutura e redação de Documentos Técnicos**, Rio de Janeiro, 2007.

LEAL, Valéria *et al.*, **Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia**. São Paulo: Tiki Books; Santa Cruz do Sul: UNISC, 2019.

RAMOS, Elisabete. M. D. S. **Sistemas Multiplex para a detecção e caracterização Molecular de Infecções**. 2012 f 68. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal. 2012.

PARENTE, Jéssica. **Desenvolvimento de uma PCR multiplex para a detecção da infecção genital pelo papillomavírus humano (HPV) e herpesvírus humano (HHV) tipo 1 e tipo 2**. 2019. 66 f. Dissertação ( Mestrado Profissional em Análises Clínicas) - Universidade Federal do Pará. Belém, 2019.

### 9 Documentos complementares

POP LABVIR 1.1 001

POP LABVIR 1.2 e 1.3 001

FORLABVIR 07

IT LABVIR 03

POP LBAVIR 1.4 001