

6. PRODUTO TÉCNICO-TECNOLÓGICO

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

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

Aprovado por: XXXXXXXX	Comissão de Gestão da Qualidade	00/00/0000
Liberado por: XXXXXXXX	Função	00/00/0000
Verificado por: Jacqueline Cortinhas Monteiro	Função: Professora Adjunta	03/02/2022
Elaborado por: 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

Mg₂Cl₂: 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;

Mg₂Cl₂;

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°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), Mg₂Cl₂ (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 μL de cada iniciador, 1 μL de dNTPs, 0,3 μL de *Taq* DNA Polimerase e 4 μL 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 (μL)	
	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	
Volume final	25 μL	

Na CSB, transferir 21 μL de Mix para cada microtubo de 0,2 μL devidamente identificado conforme o mapa de trabalho.

Fora da CSB, adicionar 4 μL 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 Nº 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. 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