



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM ANÁLISES CLÍNICAS

ROSIAN MARINHO DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX E ELABORAÇÃO DE UM PRODEDIMENTO  
OPERACIONAL PADRÃO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO GENITAL  
PELO ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO (HHV) 1 E 2**

Belém-Pará  
2022

ROSIAN MARINHO DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX E ELABORAÇÃO DE UM PRODEDIMENTO  
OPERACIONAL PADRÃO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO GENITAL  
PELO ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO (HHV) 1 E 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas. Linha de pesquisa: Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador (a): Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado

Belém-Pará  
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

S586v Silva, Rosian Marinho da.  
Validação de uma PCR duplex e elaboração de um  
procedimento operacional padrão para o diagnóstico de  
infecção genital pelo Alphaherpesvírus humano (HHV) 1 e 2 /  
Rosian Marinho da Silva. — 2022.  
64 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Análises Clínicas, Belém, 2022.

1. Alphaherpesvírus. 2. infecção genital. 3. reação  
em cadeia da polimerase. 4. procedimento operacional  
padrão (POP). I. Título.

CDD 579.2434

---

ROSIAN MARINHO DA SILVA

**VALIDAÇÃO DE UMA PCR DUPLEX E ELABORAÇÃO DE UM PROCEDIMENTO  
OPERACIONAL PADRÃO PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO GENITAL  
PELO ALPHAHERPESVÍRUS HUMANO (HHV) 1 E 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Análises Clínicas, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas. Linha de pesquisa: Agentes infecciosos e Parasitários.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

Profa. Dra. Andrea Luciana Soares da Silva  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

Profa. Dra. Jacqueline Cortinhas Monteiro  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

Profa. Dra. Rosimar Neris Martins Feitosa  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

---

Profa. Dra. Vania Nakauth Azevedo (Suplente)  
Universidade Federal do Pará (UFPA)

A Deus e a minha família. Por me  
fazer acreditar que tudo é possível com  
dedicação e esforço.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar tão presente em minha vida, pela saúde, por ter me concedido a oportunidade de participar deste curso e por ter me proporcionado as condições necessárias para que eu chegasse a tal momento, enfim, pelas bênçãos que Ele tem derramado sobre mim. É Nele que estão firmados a minha fé, esperança e o meu amor.

Aos meus familiares, que estão sempre presentes, tanto em momentos de alegria, quanto em momentos de lutas, continuamente compartilhando do amor.

Em especial aos meus pais, Antônio da Silva (*in memoriam*) e Rosidete Marinho, que sempre me apoiaram em quaisquer circunstâncias, e o empenho de ambos para que eu tivesse uma boa educação em toda a minha vida.

As minhas irmãs, Raquel e Rafaele, pela amizade, companheirismo e cumplicidade. E ao meu cunhado, Josadabe, que está sempre presente me incentivando.

Aos amigos, principalmente, à Ingrid e à Thais que sempre estão presentes, compartilhando conhecimentos e experiências.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Fernando, pelos conhecimentos passados, por me permitir fazer algo tão desafiador e pela paciência com a conclusão deste trabalho, enfim, pelo apoio nessa minha conquista.

Ao LabVir da UFPA que me possibilitou a realização deste estudo. Um agradecimento mais que especial à Eduarda e à Profa. Jacqueline, que foram incríveis. Muito obrigada pela ajuda.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta etapa.

## RESUMO

**Introdução:** Estima-se que 67% e 11% da população mundial esteja com infecção por *Alphaherpesvírus humano 1* (HHV-1) e 2 (HHV-2), respectivamente. O diagnóstico é frequentemente clínico com base nas lesões características, geralmente associado com exames laboratoriais. No qual, o padrão ouro permanece sendo o isolamento viral em cultura celular, porém este método apresenta limitações de sensibilidade, além do tempo relativamente prolongado para liberação dos resultados. Por isso, o uso de uma técnica de PCR duplex pode ser aplicado, para permitir um diagnóstico mais rápido e simultâneo. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo validar uma técnica de PCR duplex para o diagnóstico da infecção genital pelo HHV-1 e HHV-2. **Métodos:** Estudo do tipo pesquisa metodológica e desenvolvimento de tecnologia em saúde a ser realizada em 2 etapas: validação da PCR e construção do procedimento operacional padrão (POP). **Resultados:** A PCR duplex dentre as 46 amostras testadas foi positiva para HHV-1 em 12 (26,08%) amostras e em 01 (2,17%) para HHV-2. Com isso foi possível à produção de um POP com objetivo de padronizar as atividades inerentes às sequências operacionais da técnica para minimizar a ocorrência de desvio na execução e assegurar um serviço de qualidade. **Conclusão:** A validação proposta neste trabalho mostrou que a PCR desenvolvida pode ser usada como uma ferramenta para o diagnóstico em infecções genitais causadas por HHV-1 e HHV-2. Este estudo gerou um POP sobre as etapas a serem seguidas pelo executor para minimizar erros, garantindo dessa forma obtenção de resultados de qualidade.

**Palavras-chave:** *Alphaherpesvirus*; infecção genital; reação em cadeia da polimerase; procedimento operacional padrão (POP).

## Abstract

**Abstract:** It is estimated that 67% and 11% of the world population is infected with human alphaherpesvirus 1 (HHV-1) and 2 (HHV-2), respectively. The diagnosis is often clinical based on lesions characteristics, generally associated with laboratory tests. In which, the gold standard remains viral isolation in cell culture, however this methodology has sensitivity limitations in addition to the long time for the release of results. For this reason, the use of a duplex PCR technique can be applied, for a simultaneous and faster diagnosis. **Objective:** The present study aimed to employ a duplex PCR technique for the diagnosis of HHV-1 and HHV-2 genital infection. **Methods:** It's a study of methodological research and development of health technology to be realized in 2 stages: PCR validation and construction of the standard operating procedure (SOP). **Results:** 46 samples were positive for HHV-1 in 12 (26.08%) and in 01 (2.17%) for HHV-2 by duplex PCR. It was possible, through this, to produce a SOP aiming to standardize the activities inherent to the operational sequences of the technique to minimize the occurrence of deviation in the execution and guarantee a quality service. **Conclusion:** The validation proposed in this work showed that the PCR developed can be used as a diagnostic tool in genital infections caused by HHV-1 and HHV-2. This study generated a SOP regarding the steps to be followed by the performer to minimize errors, thus ensuring quality results.

**Keywords:** *Alphaherpesvirus*; genital infection; polymerase chain reaction; standard Operating Procedure (SOP).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|            |                                                                                                                                                       |    |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - | Estrutura do Herpesvírus                                                                                                                              | 19 |
| Figura 2 - | Replicação viral                                                                                                                                      | 23 |
| Figura 3 - | Latência e Reativação                                                                                                                                 | 24 |
| Quadro 1 - | Iniciadores empregados na reação de PCR duplex, com seus respectivos alvos, tamanho do fragmento e sequência                                          | 32 |
| Tabela 1-  | Quantificação de DNA                                                                                                                                  | 34 |
| Figura 4-  | Foto do gel de agarose a 2% com os produtos da PCR para pesquisa do HHV-1 e HHV-2 em amostras cérvico-uterinas, corado com brometo de etídio.         | 35 |
| Figura 5-  | Foto do gel de agarose a 2% com os produtos da PCR para pesquisa do HHV-1 e HHV-2 em amostras cérvico uterina diluídas, corado com brometo de etídio. | 36 |
| Figura 6-  | Cabeçalho padrão do LabVir/UFGA                                                                                                                       | 42 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|             |                                                                               |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| ⟨-TIF       | ⟨- <i>trans-inducting-factor</i> ou Fator indutor de transcrição de proteínas |
| de fase α   |                                                                               |
| CD8+        | Linfócito T citotóxico                                                        |
| CS          | <i>condroitin sulphate</i>                                                    |
| DNA         | Ácido desoxirribonucleico                                                     |
| dNTP        | Deoxinucleotídeos trifosfatados                                               |
| dATP        | deoxiadenosina trifosfato                                                     |
| dCTP        | deoxicitidina trifosfato                                                      |
| dGTP        | deoxiguanosina trifosfato                                                     |
| dTTP        | deoxitimidina trifosfato                                                      |
| DS          | <i>dermatan sulphate</i>                                                      |
| ELISA       | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>                                      |
| EUA         | Estados Unidos da América                                                     |
| gC          | glicoproteínas virais                                                         |
| HCF         | Fator celular do hospedeiro                                                   |
| HHV-1       | <i>Alphaherpesvírus humano 1</i>                                              |
| HHV-2       | <i>Alphaherpesvírus humano 2</i>                                              |
| HHV-3       | <i>Alphaherpesvírus humano 3</i>                                              |
| HS          | sulfato de heparina                                                           |
| HSE         | Encefalite Herpética                                                          |
| HSV-1       | Vírus Herpes Simplex tipo 1                                                   |
| HSV-2       | Vírus Herpes Simplex tipo 2                                                   |
| <i>HVEM</i> | <i>herpesvirus entry-mediator</i>                                             |
| ICP         | <i>Infected cell protein</i>                                                  |
| ICTV        | Comitê Internacional de Taxonomia Viral                                       |
| IF          | Imunofluorescência                                                            |
| IgG         | Imunoglobulina G                                                              |
| IgM         | Imunoglobulina M                                                              |
| ISTs        | Infecções sexualmente transmissíveis                                          |
| Kpb         | Kilo pares de base                                                            |
| LAT's       | Transcritos associados a latência Gene associado a latência                   |
| miRNAs      | micro RNA                                                                     |

|                  |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| MRC-5            | Fibroblastos de pulmão embrionário humano                                |
| NAT              | Teste de amplificação de ácido nucleico                                  |
| nm               | Nanômetro                                                                |
| OCT              | Fator de ligação em octâmero-1 ou Proteínas reguladoras de transcrição 1 |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde                                             |
| PCCU             | Preventivo do Câncer do Colo do Útero                                    |
| PCR              | <i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)        |
| POP              | Procedimento operacional padrão                                          |
| RNA              | Ácido ribonucleico                                                       |
| RNA <sub>m</sub> | RNA mensageiro                                                           |
| TNF              | Fator de necrose tumoral                                                 |
| UL               | <i>Long unique sequence</i>                                              |
| US               | <i>Short unique sequence</i>                                             |
| UV               | Ultra violeta                                                            |
| VHS              | <i>Virion host shut-off protein</i>                                      |
| VP               | <i>Virion polypeptides</i>                                               |
| WB               | Western blotting                                                         |

## SUMÁRIO

|            |                                                      |           |
|------------|------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b>                                    | <b>13</b> |
| <b>1.1</b> | <b>Sobre o tema</b>                                  | <b>13</b> |
| <b>1.2</b> | <b>Motivação, problemática e questão da pesquisa</b> | <b>14</b> |
| <b>1.3</b> | <b>Justificativa</b>                                 | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS</b>                                     | <b>17</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo geral</b>                                | <b>17</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivos específicos</b>                         | <b>17</b> |
| <b>3</b>   | <b>MARCO REFERENCIAL</b>                             | <b>18</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Alphaherpesvírus humano</b>                       | <b>18</b> |
| 3.1.1      | Histórico                                            | 18        |
| 3.1.2      | Taxonomia                                            | 18        |
| 3.1.3      | Morfologia e organização genômica                    | 19        |
| 3.1.4      | Replicação viral                                     | 19        |
| 3.1.5      | Latência e reativação                                | 23        |
| 3.1.6      | Manifestações clínicas                               | 24        |
| <b>3.2</b> | <b>Diagnóstico</b>                                   | <b>27</b> |
| 3.2.1      | Isolamento viral em cultura de célula                | 27        |
| 3.2.2      | Sorológico                                           | 27        |
| 3.2.3      | Citológico                                           | 28        |
| 3.2.4      | Reação em cadeia da polimerase (PCR)                 | 28        |
| <b>4</b>   | <b>MÉTODOS</b>                                       | <b>31</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Tipo de estudo e aspectos éticos</b>              | <b>31</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Etapas operacionais do estudo</b>                 | <b>31</b> |
| 4.2.1      | Etapa 1- Otimização e validação da PCR duplex        | 31        |
| 4.2.2      | Etapa 2- Produção do POP                             | 33        |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS</b>                                    | <b>34</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Etapa 1- Otimização e validação da PCR duplex</b> | <b>34</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Etapa 2- Produção do POP</b>                      | <b>37</b> |
| <b>6</b>   | <b>PRODUTO TÉCNICO-TECNOLÓGICO</b>                   | <b>43</b> |
| <b>7</b>   | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>                          | <b>57</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b>                                   | <b>58</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Sobre o tema

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) são altamente prevalentes no mundo, representam uma grande preocupação global de saúde, já que 1 milhão de ISTs são adquiridas todos os dias. Em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que o número de pessoas acometidas por IST curáveis (clamídia, gonorréia, sífilis ou tricomônioase) no mundo, anualmente, seria, aproximadamente 357 milhões, sendo que mais de 500 milhões de pessoas tenham infecção genital pelo *Alpha herpesvirus humano 1 e 2* (HHV-1/HHV-2) (WHO, 2019).

Amplamente disseminado na população mundial, o HHV tem o homem como o único hospedeiro, no qual estes vírus se mantêm viáveis por toda a vida do hospedeiro. Estima-se que 67% e 11% da população mundial estejam com infecção por HHV-1 e HHV-2, respectivamente (WHO, 2017). Esses vírus são considerados como causas significativas de morbidade e mortalidade em neonatos (LOOKER *et.al*, 2015).

O herpes simples é uma doença infectocontagiosa humana muito comum, causada por diferentes tipos de vírus (HHV-1 e HHV-2) (PENELLO *et al.*, 2010). O seu diagnóstico é frequentemente clínico com base nas lesões características de um a três dias, mas devido à dificuldade em fazer o diagnóstico das infecções persistentes e a crescente prevalência mundial de herpes, há uma demanda crescente por diagnóstico laboratorial rápido e preciso de pacientes com HHV.

O diagnóstico clínico dessa doença constitui um grande desafio para os médicos, devido a possibilidade de sobreposição dos sinais e sintomas com as diferentes IST's, o que dificulta um diagnóstico clínico preciso. Ressaltando que as IST's podem ser causadas por diferentes agentes microbianos cujos sintomas assemelham-se às infecções virais, levando ao uso de antibióticos de forma inadequada. Dessa forma, a distinção entre as espécies de HHV é importante não só do ponto de vista epidemiológico, mas essa distinção pode fornecer informações úteis para o prognóstico da doença. Essas informações podem auxiliar no manejo terapêutico antiviral adequado e no aconselhamento para infecção primária, parto intraparto e terapia supressiva (MILLER *et. al.*, 2012).

Então para solucionar este problema, é necessário o estabelecimento de estratégias diagnósticas moleculares mais sensíveis e específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que consiste na detecção dos genomas dos microrganismos alvo. A introdução desta técnica para diagnóstico e detecção de patógeno tem sido uma valiosa alternativa, pois há um aumento da sensibilidade, especificidade e acurácia em relação aos métodos tradicionais, como isolamento viral em cultura de célula. Este é o método clássico utilizado em laboratório para o diagnóstico de infecção por herpes, mas é demorado e tem baixa sensibilidade (CURTIN *et al.*, 2013). Ao comparar a PCR em tempo real quantitativa em formato duplex para HHV-1 e HHV-2 com cultura de vírus para o diagnóstico de HHV-1 e HHV-2 genital e cutâneo usando amostras de esfregaço, a técnica molecular, mostrou-se mais sensível do que o método padrão ouro para o diagnóstico de infecções mucocutânea por HHV, aumentando a taxa de detecção em 27% (FILÉN *et al.*, 2004; LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014; MURALIDHAR, 2015)

## **1.2 Motivação, problemática e questão da pesquisa**

Os HHV estão presentes em alta prevalência em seres humanos (DICKSON *et al.*, 2014; SUAZO *et al.*, 2015). Além disso, estudos apontam uma mudança no padrão de comportamento do vírus, em que a prevalência de HHV-1 mostra-se como maior causador em infecções herpéticas genitais, superando o HHV-2 (PENA *et al.*, 2010; PERREIRA *et al.*, 2012; BERNSTEIN *et al.*, 2013). Os possíveis fatores para essa substituição ainda não estão totalmente esclarecidos, acredita-se que isso seja devido as taxas mais baixas de infecções orais por HHV-1 na infância e a consequente baixa imunidade à infecções genitais por HHV-1 transmitidas sexualmente ou a mudança no comportamento sexual consequentemente levando ao aumento do contato orogenital (PENA *et al.*, 2010). A idade, condição socioeconômica, etnia e localização geográfica também influenciam nesse cenário (PENA *et al.* 2010; LUPI, 2011; PEREIRA *et al.*, 2012). Enquanto as apresentações do herpes genital inicial devido ao HHV-1 e HHV-2 são clinicamente indistinguíveis, em comparação com a infecção genital por HHV-1, a infecção genital por HHV-2 recorre com mais frequência e está associada a taxas mais altas de excreção genital assintomática, diferenças que podem afetar as decisões de manejo (POL *et al.*, 2012).

As IST's por estarem cada vez mais prevalentes constituem-se ainda em sério problema de saúde pública, gerando assim também um elevado custo financeiro. Os custos associados com infecções por HHV em unidades emergenciais dos Estados Unidos no período de 2006 era de 45 milhões de dólares e em 2013 este custo aumentou para 94 milhões (XIA *et al.*, 2018).

O diagnóstico laboratorial para HHV continua sendo a cultura viral, apesar de demorado, trabalhoso e depender de infecção sintomática (vesículas ou úlceras), ainda é considerado o padrão-ouro. Além disso, maioria da transmissão horizontal e vertical do HHV ocorre durante a eliminação não reconhecida ou assintomática, e grande parte das pessoas infectadas com HHV-2 não tem conhecimento de sua infecção (KOELLE; WALD, 2000). Desta forma, o desenvolvimento de técnicas moleculares permite que seja identificado material genético de patógenos causadores dessas infecções quando contido nas amostras, mesmo em indivíduos assintomáticos. Dentre esses métodos, a PCR favorece a otimização do diagnóstico das infecções porque permite que ele seja mais rápido, sensível e acurado (LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014; MURALIDHAR, 2015). Outra importante relevância do diagnóstico precoce das IST's é a sinergia com infecção pelo HIV. Segundo a literatura, há evidências de que a infecção por HHV-2 é um impulsionador significativo da epidemia de HIV, aumentando em três vezes o risco de aquisição do HIV (MATHEW *et al.*, 2018). Portanto, as IST's aumentam tanto a suscetibilidade quanto a infectividade relativas à transmissão da infecção pelo HIV (OMS, 2016). Então, atualmente os avanços nos métodos de diagnóstico têm focado na busca pelo diagnóstico mais acurado, visando novos métodos de diagnóstico, o que tem beneficiado inúmeros pacientes, principalmente imunodeprimidos (pessoas que vivem com HIV e transplantados), portadores de doença crônica, entre outros, favorecendo assim sua sobrevivência, uma vez que esses pacientes tornam-se susceptíveis as infecções como as lesões herpéticas que são vistas como a de maior prevalência em paciente com retrovirose (LEGOFF; PÉRÉ; BÉLEC, 2014; GROVES, 2016; OMS, 2016).

### **1.3 Justificativa**

Dada a dificuldade em fazer o diagnóstico com base somente nos sintomas clínicos do HHV-1 e 2 e a crescente prevalência mundial de herpes, há uma

demanda crescente por diagnóstico laboratorial rápido e preciso de pacientes com HHV. Uma vez que, há um grande desafio para o diagnóstico adequado na prática clínica, pelo fato deste ser realizado na maioria das vezes com base nos sintomas clínicos presentes, porém estes podem ser mal interpretados, pois apresentam-se semelhantes a outras infecções, causando um diagnóstico errôneo. A sensibilidade das avaliações médicas para aqueles que relatam sintomas de IST é relativamente maior do que para aqueles que não relataram sintomas, estudos relatam que 65% a 90% dos pacientes com infecção genital por HHV desconhecem sua presença e apenas 20% dos pacientes que sofrem de herpes genital são diagnosticados corretamente. Além disso, existe falha na detecção de indivíduos assintomáticos, sendo uma das limitações da abordagem sindrômica. Diagnósticos incorretos resultam em procedimento terapêutico incorreto e disseminação adicional do vírus na população humana ( GROVES, 2016; OMS, 2016).

Apesar do método de cultivo celular ser considerado o padrão ouro para o diagnóstico das infecções por HHV-1 e 2, este apresenta limitações como sensibilidade e tempo relativamente prolongado para liberação de resultados. Com as técnicas de cultura viral, o tempo de resposta foi em média 108 horas para um resultado positivo e 154 horas para um resultado negativo. O tempo de resposta usando PCR foi determinado em média 48 horas (MARSHALL *et al.*, 2001).

Diante disso, a técnica de PCR duplex pode ser utilizada, pois apresenta menor custo, permitindo um diagnóstico mais rápido e simultâneo quando comparado com a cultura, bem como a identificação mais precisa do vírus, podendo diferenciá-los.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Validar uma técnica de PCR duplex para o diagnóstico da infecção genital pelo *Alphaherpesvírus humano* (HHV) tipo 1 e tipo 2 em amostras cérvico-uterinas de mulheres da cidade de Belém, Pará.

### 2.2 Específicos

- Otimizar e validar a PCR duplex para detecção de HHV-1 e HHV-2 em amostras cérvico-uterinas;
- Elaborar um procedimento operacional padrão, como instrumento de etapas para detecção de infecção por herpesvírus simples em amostras cérvico-uterinas.

### 3. MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 Alphaherpesvírus humano

##### 3.1.1 Histórico

O vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), denominado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como *Alphaherpesvirus humano 1* (HHV-1), foi documentado primariamente em 460/377 a.C. pelo médico da Grécia Antiga, Hipócrates de Cós, que criou o termo *herpes* (derivado do grego herpein = rastejar, réptil). Neste documento relatou lesões que hoje são atribuídas ao vírus, descrevendo-as como vesículas e ulcerações. Todas estas manifestações caracterizavam a doença *Herpes febrilis*, que foi descrita mais tarde por Heródoto (484/425 a.C.) (MCGEOCH; RIXON; DAVISON, 2006). Entretanto, no ano 3000 a.C em uma tabuleta Suméria e em 1500 a.C no Papiro Ebers, um dos tratados médicos mais antigos que se tem notícia, já haviam sido descritas as primeiras lesões genitais que lembram as lesões causadas por HHV-1 (PELLET *et al.*, 2013).

Após relatos do médico do rei Luís XIV, John Astruc, e também de Unna em 1883, que descreveram a ocorrência de herpes genital em prostitutas francesas, esta doença foi descrita como sendo uma doença vocacional, pois era encontrada em prostitutas (PELLET; ROIZMAN, 2013). Porém, somente entre 1920 a 1960 (séc. XX), foi demonstrado que os isolados virais infectavam uma imensa gama de hospedeiros, como ratos, camundongos, coelhos, cobaias e macacos (MIRANDA, 2002). Posteriormente, em 1968, os herpesvírus foram classificados no gênero *Simplex*, e baseado em suas diferenças imunológicas, epidemiológicas e clínicas, foram divididos em duas espécies, denominando-as inicialmente de HSV- 1 e HSV-2 (NAHMIAS; DOWDLE, 1968).

##### 3.1.2 Taxonomia

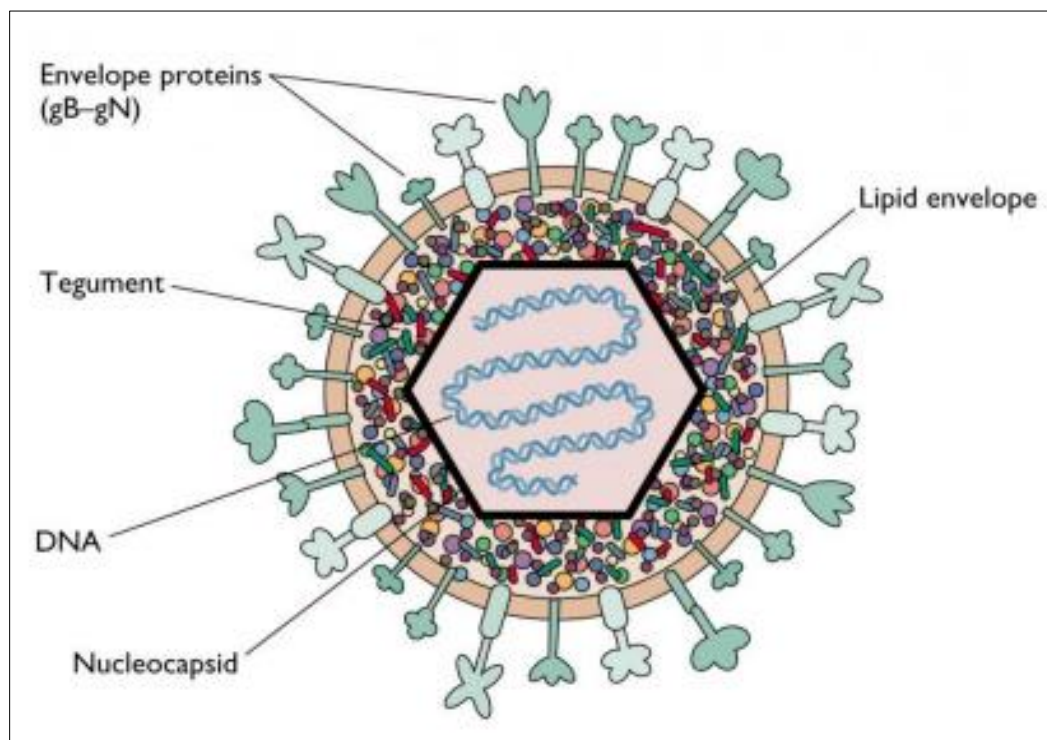
As infecções herpéticas são causadas pelo HHV, pertencente a extensa e heterogênea família *Herpesviridae*, composta por inúmeros patógenos que causam infecções em animais e humanos. Esta família é subdividida em 3 subfamílias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*), de acordo com suas propriedades biológicas e filogenéticas (BOIVIN, 2004). Cada uma delas apresenta um comportamento específico, com um padrão de infecção latente em determinadas células (WIGG *et al.*, 2008). A subfamília *Alfaherpesvirinae* é constituída pelos HHV-

1, HHV-2 e HHV- 3 (vírus Varicela-Zoster) (COLLINS; ELLIS, 2004). Esta subfamília tem um tropismo pelo sistema nervoso e apresenta um ciclo reprodutivo relativamente curto, com rápida lise das células infectadas e período de latência em gânglios sensoriais, ou seja, o vírus tem como característica biológica o rápido crescimento em cultivo celular, uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade, comum a todos os herpesvírus, com tendência a estabelecer infecção latente em neurônios/gânglios sensoriais por tempo indeterminado (COLLINS; ELLIS, 2004). Entretanto, dentre os herpesvírus existentes nesta subfamília, os de interesse para este estudo são os pertencentes ao gênero *Simplexvirus*, HHV-1 e HHV-2.

### 3.1.3 Morfologia e organização genômica

O HHV (HHV-1 e HHV-2) é uma partícula esférica, com diâmetro de aproximadamente, 186 nm. Estruturalmente é composto por quatro partes: genoma, capsídeo icosaedrico, tegumento e envelope (LOOKER *et al.*, 2015; Figura 1).

Figura 1- Estrutura do Herpesvírus



Fonte: Adaptado de Miura (2013).

O genoma do vírus consiste em uma molécula de DNA fita dupla linear, com aproximadamente 152 kpb no HHV-1 apresentando uma proporção de guanina +

citossina de 68,3% e 155 kpb no HHV-2 com proporção de 70,4% (ROIZMAN *et al.*, 2007). O genoma é constituído por dois segmentos covalentemente ligados entre si, formando uma sequência única (U), o segmento L (*Long*, longo) e S (*Short*, curto). Estas sequências são chamadas de UL e US que são flanqueadas por repetições invertidas de grande tamanho. No genoma viral são codificadas 84 proteínas, as quais codificam cerca de 100 proteínas que irão compor o capsídeo, os componentes do envelope viral, o tegumento e outras proteínas que são geradas durante o ciclo de replicação (PELLET *et al.*, 2013).

O capsídeo é icosaédrico composto por 162 capsômeros, seu diâmetro varia de 100-110 nm. Ele é constituído por cinco componentes proteicos estruturais, a VP5 (U<sub>L</sub>19) mais predominante, e menos abundantes a VP19C (U<sub>L</sub>38), VP23 (U<sub>L</sub>18), VP24 (U<sub>L</sub>26) e VP26 (U<sub>L</sub>35). A forma com que estas proteínas estão distribuídas cria um poro para passagem do DNA ao exterior do vírus (MIRANDA, 2002; GELLET *et al.*, 2012; PELLET *et al.*, 2013).

O tegumento é uma camada amorfa, composta por 18 a 20 proteínas virais, das quais as mais importantes são: ICP5, VHS e  $\alpha$ -TIF (MIRANDA, 2002; ROIZMAN *et al.* 2013). Estas proteínas são importantes na regulação do ciclo replicativo e evasão do sistema imune (SEN *et al.*, 2013).

O envelope tem aparência trilaminar, com glicoproteínas virais distintas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gL, gM e gN), este invólucro que corresponde a estrutura externa do vírus é composto por uma bicamada lipídica tendo origem em membranas celulares (METTENLEITER; KLUPP; GRANZOW, 2009; PELLET *et al.*, 2013).

### 3.1.4 Replicação viral

Quando comparado aos demais herpesvírus, estes vírus apresentam um ciclo de replicação rápido (entre 18 a 20 horas) e citolítico (CLEATOR *et al.*, 2004; WIGG *et al.*, 2008). A infecção pelo HHV começa com a etapa de adsorção, que compreende a ligação do vírus à superfície da célula alvo. Esta etapa ocorre pela ligação de glicoproteínas virais gC (para HHV-1) e gB (para HHV-2) aos receptores de superfície celular (proteoglicanos), principalmente sulfato de heparina (HS) (CLEATOR; KLAPPER, 2004; ACHESON, 2007). Outros receptores como *condroitin sulphate* (CS) e *dermatan sulphate* (DS), também podem ser utilizados na interação

das glicoproteínas (MIRANDA, 2002; ROIZMAN *et al.*, 2007). Em seguida, a gD interage de forma estável (irreversível) com os receptores secundários como *herpesvirus entry-mediator* ou HVEM (membro da família de receptores de TNF), receptores tipo 1 e 2 da nectina (membro da superfamília das Imunoglobulinas) ou HS especificamente modificado, que irão promover uma alteração conformacional, que juntamente com a glicoproteínas B, H e L irão promover a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática da célula hospedeira (ROIZMAN *et al.*, 2007; CAMPADELLI *et al.*, 2012).

Após a fusão das membranas viral e celular, ocorre a liberação de nucleocapsídeo e proteínas do tegumento no citoplasma. Através dos microtúbulos (citoesqueleto) o nucleocapsídeo e proteínas do tegumento são transportadas em direção ao núcleo, alcançando os poros da membrana nuclear, ocorrendo a penetração do DNA viral que circulariza no núcleo, mesmo com ausência de síntese proteica (MIRANDA, 2002; STRANG; STOW, 2005). Para que ocorra essa penetração é necessário a presença da proteína  $\alpha$ -TIF (também chamada de VP16 ou ICP25) (ROIZMAN *et al.*, 2007).

No núcleo com o DNA viral circular, ocorre a transcrição, replicação e montagem de novos capsídeos (MIRANDA, 2002). A transcrição inicia quando a RNA polimerase II da célula infectada sintetiza RNAm a partir do DNA viral. O processo de expressão gênica acontece de forma sequencial e coordenada, sendo estimulada pela proteína  $\alpha$ -TIF, em três fases: imediatamente precoces ou de fase  $\alpha$ , precoces ou de fase  $\beta$  e tardios ou fase  $\gamma$  (CLEATOR; KLAPPER, 2004; ROIZMAN *et al.*, 2007). (Figura 2)

A fase  $\alpha$  acontece devido a formação de um complexo ativador transcricional, formado pela proteína do tegumento VP16/alfa-TIF em conjunto com a proteína OCT-1 (Fator de ligação em octâmero-1) e com o fator celular do hospedeiro (HCF), que ao se ligar ao TATA BOX no genoma viral, formam o complexo de pré-iniciação viral (PELLETT *et al.*, 2013; ROIZMAN *et al.*, 2013). Neste processo há formação de seis proteínas ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e US1.5 (ROIZMAN *et al.*, 2013). Estas são levadas para o núcleo, uma vez que são responsáveis pela regulação gênica da próxima etapa de transcrição e tradução dos genes  $\beta$ . A ICP0 é responsável por estimular a expressão de genes do HHV-1 pertencentes às fases  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (HANCOCK *et al.*, 2006). A proteína ICP4 responsável por reprimir a

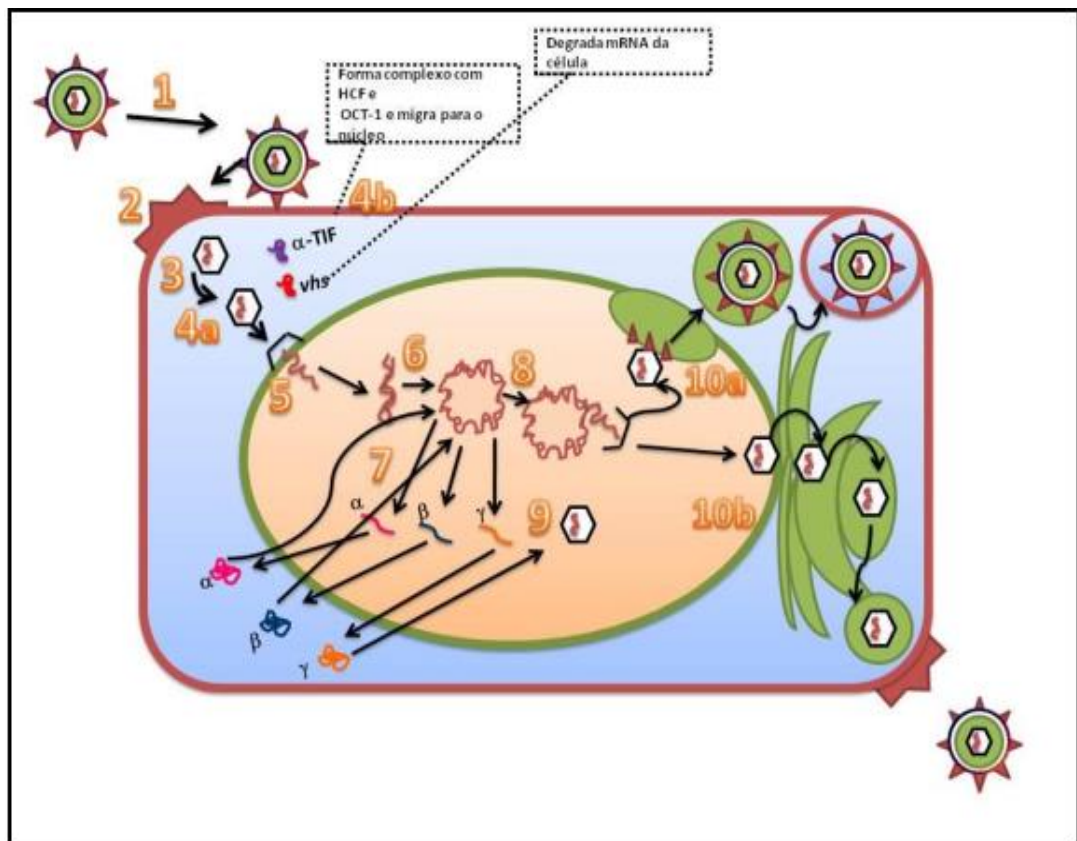
expressão dos genes imediatamente iniciais (CARROZZA; DELUCA, 1996; GU; DELUCA, 1994; ROBERTS *et al.*, 1988) e através da interação com fatores da RNA polimerase II ativar a expressão dos genes E ou L (GU; DELUCA, 1994; SMITH *et al.*, 1993). A ICP22 é importante para expressão eficiente dos genes da fase  $\beta$  e  $\gamma$ , mas não é essencial para a replicação do HHV-1 em cultura (O'TOOLE *et al.*, 2003). A ICP27 inibe o processamento do RNAm (LINDBERG; KREIVI, 2002; SANDRI-GOLDIN; MENDOZA, 1992) e a ICP47 impede o transporte de peptídeos antigênicos para o retículo endoplasmático (HILL *et al.*, 1995), sendo crucial para a neurovirulência, uma vez que inibe a resposta da célula TCD8+. Seu pico de síntese proteica acontece entre 2-4 horas após a infecção (CLEATOR; KLAPPER, 2004; RESENDE, 2012).

Na fase  $\beta$  ou precoce, são sintetizadas enzimas (timidina cinase, ribinucleotideo redutase, desoxirribonuclease, etc) e proteínas (DNA polimerase, helicase, etc) que estão envolvidas no metabolismo, assim como na síntese de DNA viral. Nesta fase também ocorre ativação dos genes tardio  $\gamma$ , com pico da síntese de proteína entre 5-7 horas após o início da infecção (CLEATOR; KLAPPER, 2004; RESENDE, 2012; ROIZMAN *et al.*, 2013).

Os genes da fase  $\gamma$  são responsáveis pela produção de proteínas estruturais do nucleocapsídeo e todas as outras que formarão os vírions, como as glicoproteínas presentes no tegumento e no envelope, dentre elas tem-se gB, gC, gD e gE. O pico de expressão é de aproximadamente 12 horas (CLEATOR; KLAPPER, 2004; RESENDE, 2012).

Estas proteínas estruturais irão promover a formação dos pré-capsídeos que podem estar vazios ou preenchidos com DNA viral. Esses nucleocapsídeos ligam-se a membrana nuclear interna, onde são temporariamente envelopados e liberados no espaço perinuclear, ocasionando num aumento de vírus envelopado neste local. Posteriormente, há uma fusão com a membrana nuclear externa, o invólucro formado anteriormente é perdido, gerando um acúmulo de capsídeos sem envelope no citoplasma. Estes capsídeos adquirem um novo envelope com proteínas virais, através de vesículas derivadas do complexo de Golgi. Após o envelopamento, os vírus são transportados para a superfície celular, onde irão se fundir com a membrana citoplasmática, e finalmente são liberados por exocitose para o espaço extracelular (CLEATOR; KLAPPER, 2004; RESENDE, 2012; ROIZMAN *et al.*, 2013).

Figura 2 – Replicação viral



Fonte: Adaptado de Miranda (2002).

### 3.1.5 Latência e reativação

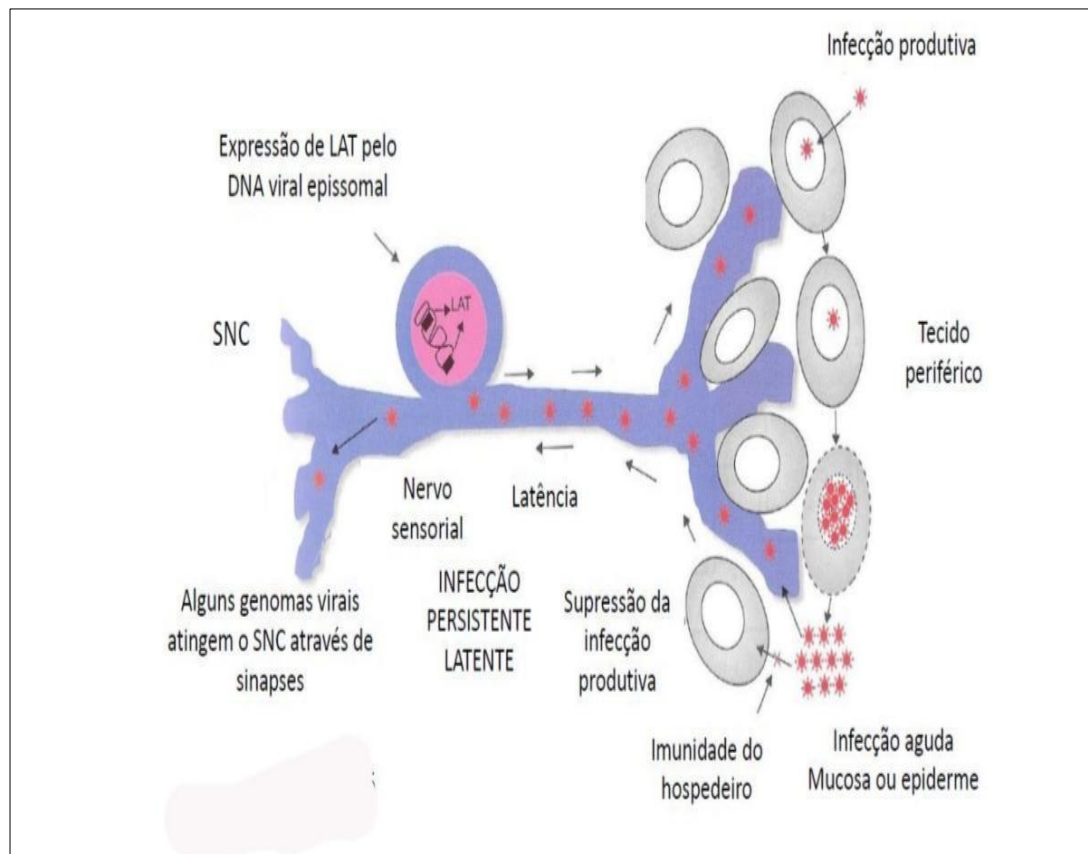
O HHV tipo 1 e 2 estabelecem infecção latente nos seus hospedeiros após a infecção aguda. Após estabelecer o ciclo lítico no sítio primário e replicação ativa nas mucosas, os vírus são conduzidos por um transporte axonal retrógrado, adentrando nos nervos sensoriais, geralmente resultando em um estado de latência. Este estado é um importante aspecto biológico para manutenção e disponibilidade do vírus no hospedeiro (ROIZMAN *et al.*, 2013).

No período de latência, são apenas expressos inúmeros transcritos associados a latência (LAT's), esses genes virais não são requeridos na infecção ativa, sendo que a expressão de todos os genes líticos se encontra reprimida. Postula-se que estes transcritos desempenham vários papéis na latência e esta fase é também a fonte de miRNAs que podem também modular a infecção (GARBER; SCHAFFER; KNIPE, 1997; UMBACH *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2014).

A reativação ocorre quando estes vírus retornam através do transporte anteretrógrado pelos axônios, causando uma infecção recorrente no sítio da infecção inicial ou próximo deste sítio.

Nos outros tecidos são expressos o fator nuclear OCT-1, enquanto no sistema nervoso é o local onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2. Na maioria dos tecidos a proteína do tegumento viral  $\alpha$ -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação junto ao TATA BOX do genoma do HSV, iniciando a transcrição de genes de fase alfa, com consequente infecção produtiva (PRESTON, 2000).

Figura 3 - Latência e Reativação



Fonte: Santos (2015).

### 3.1.6 Manifestações clínicas

O HHV-1 está primariamente associado com infecções nas regiões oral, facial e ocular, enquanto que o HHV-2 está comumente associado com infecções genitais,

envolvendo caracteristicamente a genitália e a pele abaixo da cintura (NEVILLE *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2012). Porém, estudos têm demonstrado uma mudança nesse padrão em que há casos de infecção genital pelo HHV-1 e oral pelo HHV-2 (LYCKE, 1991; OMS, 2017).

As infecções agudas são caracterizadas pelo desenvolvimento de uma ou mais vesículas pequenas e cheias de líquido, as quais formam elevações na pele ou qualquer outra membrana mucosa do corpo, como forma de manifestação primária ou reativação do vírus. Essas vesículas comumente rompem formando áreas ulceradas e causa dor, estas características são precedidas de sintomas clínicos como formigamento, ardor e coceira no local (GOPAL *et al.*, 2000; LUPI, 2000; MCCORMACK *et al.*, 2005; PELLET; ROIZMAN, 2013).

As manifestações clínicas variam de indivíduo para indivíduo e com o tipo de vírus envolvido (LANGENBERG *et al.*, 1999; BERNSTEIN *et al.*, 2013). O HHV-1 tem como característica principal lesões brandas ao redor da boca (gengivoestomatite, herpes labial), mas podendo se manifestar de forma mais severa, principalmente em pacientes imunossuprimidos/imunodeprimidos, ocasionando complicações como ceratoconjuntivite e encefalite (CONSOLARO; CONSOLARO, 1999). O HHV-2 ocasiona em infecções genitais como úlceras dolorosas na região peniana, vulva e períneo (GELLET *et al.*, 2012). Ambos os vírus podem desenvolver sua sintomatologia, mas eles geralmente apresentam-se de forma assintomática ou permanecem latentes no seu hospedeiro, podendo causar recidivas constantes. Existem estudos demonstrando que durante as infecções recorrentes apenas 5 a 15% dos infectados exibem sintomas clínicos relacionados a infecções por HHV, ou seja, a maioria dos indivíduos são assintomáticos (BENEDETTI; ZEH; COREY, 1999; WALD *et al.*, 2000; SUDENGA *et al.*, 2012; SUAZO *et al.*, 2015). Dentre os fatores que estão envolvidos na reativação viral são relatados o estresse físico e emocional, ansiedade, febre, exposição a raios ultravioleta, dano tecidual, corticoterapia e alguma patologia que promova a imunodepressão (PELLET; ROIZMAN, 2013).

Devido esses vírus se tornarem latentes, não ocorre uma variação sazonal na incidência das infecções, pois esta característica do vírus proporciona a ocorrência de infecções recorrentes de herpes, tornando possível a transmissão do vírus em qualquer período do ano (ROIZMAN *et al.*, 2013). A fase assintomática é

reconhecida como a fonte mais importante de transmissão do HHV-1 (KOELLE; WALD, 2000).

A transmissão do HHV ocorre quando há o contato direto com fluidos (saliva, sêmen, secreções cervicais) nos quais os vírus estão presentes ou na presença de lesões herpéticas que ao entrarem em contato com a pele, mucosa da boca ou genital, o vírus penetra no organismo, infectando dessa forma as células epiteliais (CHAYAVICHITSILP *et al.*, 2009). Portanto, a via de transmissão pode ser através de relações sexuais (oral, anal ou vaginal) desprotegidas, via vertical, auto-inoculação e objetos contaminados (CARVALHO; ANCHIETA; ROMANELLI, 2014). O período de incubação do gênero *Simplexvirus* varia de 3 a 9 dias. (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

## 3.2 DIAGNÓSTICO

### 3.2.1 Isolamento viral em cultura de célula

Considerado o padrão ouro na detecção do HHV-1 e 2, embora o vírus também possa ser isolado a partir da membrana corioalantóica de ovos embrionados, inoculação em animais de laboratório (camundongos recém-nascidos) (SANTOS, 2015; ZHU *et al.*, 2017). O material proveniente do raspado de vesícula dérmica é coletado em *swab* para posteriormente ser semeado em meio de cultura, preferencialmente fibroblastos de pulmão embrionário humano (MRC-5), após 24-48h de incubação, as alterações celulares podem ser visualizadas através do microscópio, mas pode variar até 6 dias de incubação, se a concentração de vírus na amostra for baixa. (LEGOFF; PÉRE; BÉLEC, 2014). Através da cultura de tecido o diagnóstico da infecção apresenta baixa sensibilidade, uma vez que nas lesões das infecções primárias o HHV é isolado em cerca de 80% e nas lesões recorrentes são isolados apenas 25-50% (WALD *et al.*, 2003). Este método proporciona a tipagem da cepa, através da imunofluorescência direta que constitui o procedimento mais empregado ou por ensaios moleculares (USTACELEBI, 2001; JAISHANKAR; SHUKLA, 2016).

### 3.2.2 Sorológico

Para o diagnóstico sorológico são utilizados vários métodos imunológicos, os testes para detecção de anticorpos, baseiam-se na detecção dos anticorpos IgG produzidos especificamente contra a glicoproteína gG1 (HHV-1) e gG2 (HHV-2) utilizando antígenos nativos, purificados ou recombinantes (WALD; ASHLEY-MORROW, 2002). O teste *Western blotting* (WB) é indicado para identificação do HHV-2, podendo até distinguir entre os HHV-1 e HHV-2, mas é um método caro e demorado, além de ser de difícil interpretação (COREY *et al.*, 2004). O teste de ELISA também utiliza a gG para diferenciar as infecções por HHV-1 e HHV-2, porém este método apresenta menor sensibilidade se comparado ao WB. Estes testes apresentam uma sensibilidade de 84-99% e nos estágios iniciais da infecção os resultados falso-negativos podem ser mais frequentes (HOOK, 2016). Um problema enfrentado por esses métodos, ocorre devido a identificação de algumas cepas de HHV-1 e HHV-2 que apresentam variações na glicoproteína, devido a mutações ou

deleções no gene gG. Isso dificulta o diagnóstico, além de causar uma resposta imune reduzida e até mesmo ausente, mas as lesões genitais presentes são semelhantes à infecção causada pelo vírus selvagem. Portanto, mesmo na ausência desses anticorpos específicos, a infecção por esses vírus não pode ser descartada. Então, a detecção do DNA do HHV-1 e HHV-2 ou isolamento em cultura de células juntamente com uma sorologia negativa (IgM e IgG), pode ser uma infecção primária com uma cepa que apresenta uma alteração na gG (DAIKOKU *et al.*, 2013; VAN ROOIJEN *et al.*, 2016; LEGOFF; PÉRE; BÉLEC, 2014).

A imunofluorescência (IF) detecta o antígeno viral utilizando anticorpos monoclonais específicos marcados com fluoresceína, esse ensaio pode ser direto ou indireto. Em geral, sua sensibilidade em lesões é a mesma da cultura celular, mas se comparada com a PCR apresentam uma sensibilidade inferior (BURROWS *et al.*, 2002). Os ensaios sorológicos têm sido indicados para pacientes que reportam desconforto genital e labial recorrente, mas não apresentam lesão.

### 3.2.3 Citológico

É um método em que não é possível distinguir o HHV de outras espécies de herpesvírus, ou seja, tem baixa especificidade. Este exame consiste em fazer um raspado da lesão vésico-bolhosas e posterior coloração por Hematoxilina-Eosina, para pesquisa de células escamosas multinucleadas com inclusões intracelulares.

### 3.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR baseia-se em ciclos que se repetem na forma de três etapas que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação, em um mesmo tubo. Para que uma PCR ocorra são necessários componentes que são essenciais.

- DNA molde - o DNA que será copiado, replicado, amplificado.
- DNA polimerase - conhecida como Taq DNA polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, é uma enzima termoestável capaz de utilizar uma fita molde de DNA para sintetizar uma nova fita complementar.

- Deoxinucleotídeos (dNTP) - são os precursores da nova fita de DNA específicos, devem possuir quantidades iguais de dATP, dCTP, dTTP e dGTP
- *Primers* - também conhecido como iniciadores da reação, são oligonucleotídeos (fragmentos pequenos) de fita simples sintetizados artificialmente e são desenhados para serem complementares a sequência alvo, esta escolha pode ser através de sequências já disponíveis na literatura ou de software. Eles se anexam ao DNA molde em cada lado da região alvo, sinalizando onde a enzima Taq polimerase deve começar adicionar os dNTPs.
- $MgCl_2$  - são cátions divalentes adicionados na reação para funcionarem como cofator da enzima DNA polimerase. Ele estabiliza a interação entre o primer e o DNA molde.
- Tampão - atua na manutenção do pH, geralmente entre 8,3 e 9 à temperatura ambiente que com o aumento da temperatura no termociclador o pH diminui para 7,4, que é considerado um valor ótimo para a atividade da Taq polimerase na temperatura de 72°C.
- Água - completa o volume final da reação.

A técnica de PCR é um método em que é preciso ter um conhecimento prévio de uma sequência do DNA viral, uma vez que ela promove a amplificação seletiva de sequências específicas do ácido nucleico desse vírus, com isso é possível detectá-los em amostras mesmo quando número de cópias virais for muito pequena. A amplificação de uma determinada sequência de DNA, através da extensão de *primers* que se liga com as fitas complementares de uma sequência alvo, acontece por meio do termociclador, em que ocorrem vários ciclos com mudanças de temperatura, permitindo dessa forma a desnaturação, anelamento e extensão pela ação da DNA polimerase. Sendo assim, proporcionando condições ideais é possível que a partir de uma única molécula de DNA e após alguns ciclos no termociclador é possível obter mais de 1 milhão de cópias da região alvo dos *primers* (SANTANA, 2018).

A PCR duplex ou multiplex é uma reação em que várias regiões diferentes do DNA são amplificadas ao mesmo tempo, e no mesmo recipiente, devido à utilização

simultânea de vários pares de *primers* específicos para cada *locus* a ser identificado. Se a temperatura de hibridização dos diferentes *primers* for semelhante e os diferentes fragmentos de DNA produzidos apresentarem tamanhos distintos, é possível que o diagnóstico seja realizado através de um PCR duplex ou multiplex (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

A técnica de duplex ou multiplex foi desenvolvida com a finalidade de promover a diferenciação entre várias espécies ou gêneros microbianos simultaneamente, considerando ser este um teste único e altamente específico (OLIVEIRA et al., 2007). Uma das vantagens da técnica é a maior rapidez na obtenção do resultado, assim como maior economia de reagentes, quando comparada a realização de uma PCR para cada agente infeccioso individualmente. Outra vantagem, é que como vários *locus* são amplificados simultaneamente na mesma reação, há necessidade de uma quantidade menor de ácido nucleico para o diagnóstico, que por vezes pode ser um fator limitante (ROSSETI; SILVA; RODRIGUES, 2006).

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos

Foi realizado um estudo metodológico, no qual foi empregado a técnica de PCR duplex para detecção simultânea dos *Alphaherpesvírus humano 1* e 2. Esta técnica foi desenvolvida e padronizada no laboratório de Virologia da UFPA como parte da dissertação.

Por se tratar de um estudo metodológico não se faz necessário submissão e/ou aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos.

### 4.2 Etapas operacionais

A realização deste estudo ocorreu em duas fases: (i) otimização e validação da PCR duplex em amostras cérvico-uterinas e; (ii) elaboração do Procedimento Operacional Padrão (POP).

#### 4.2.1 Fase 1- Otimização e validação da PCR duplex

O PCR duplex empregado neste estudo foi desenvolvido no Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará como parte do projeto intitulado: “Prevalência das Infecções Sexualmente Transmissíveis em adolescentes e adultos jovens, na cidade de Belém, Pará”, iniciado no ano de 2018.

Embora existam diversos guias descrevendo a validação de métodos analíticos, comparativamente, pouco materiais estão disponíveis a respeito da validação de métodos moleculares. Desse modo, para a otimização e validação da PCR adotou-se o protocolo previamente estabelecido, no qual a reação de amplificação envolveu um segmento de 143pb e 226pb das regiões RL-2 UL-28, respectivamente, dos herpesvírus investigados. A sequência dos *primers* empregados na reação estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Iniciadores empregados na reação de PCR duplex, com seus respectivos alvos, tamanho do fragmento e sequência.

| Vírus                     | HHV-1                                                            | HHV-2                                            |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Iniciadores               | H1P32<br>H1M32                                                   | H2M40<br>H2P4                                    |
| Região Alvo               | RL-2                                                             | UL 28                                            |
| Tamanho do Amplicon (pb)  | 143                                                              | 226                                              |
| Temperatura de Anelamento | 52°C                                                             | 45°C                                             |
| Sequência do Primer       | 5'-TGGGACACATGCCTTCTTGG-3'<br>5'-ACCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTACCC-3' | 5'-GTACAGACCTTCGGAGG-3'<br>5'-CGCTTCATCATGGGC-3' |

Fonte: Adaptado de Parente (2019).

Em cada reação de amplificação foi utilizado um volume final de 25 µL contendo 200 ng de DNA extraído; 200 µM de cada dNTP; 10 pmol de cada iniciador; 1,4 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 e 1 U de Taq polimerase. Foram utilizados controles internos para HHV.-1 e HHV-2, bem como empregou-se um controle negativo em cada reação. Os positivos para os herpesvírus foram provenientes de isolamento em cultura celular.

As condições de amplificação adotadas foram: 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos; ligação dos iniciadores a 60°C por 30 segundos e; extensão da cadeia a 72°C por 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 8 minutos.

Os produtos da PCR foram 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 foram registrados em sistema de fotodocumentação (Major Science).

A otimização e validação da PCR levou em consideração a especificidade dos *primers* e os limites de detecção em amostras cérvico-uterinas.

A especificidade dos *primers* empregados foi confirmada experimentalmente através de amplificações utilizando 1 ng de DNA genômico purificado de várias espécies virais pertinentes ao estudo.

Para definição do limite de detecção foi empregado 46 amostras cérvico-

uterinas com quantidades conhecidas de DNA genômico com o objetivo de avaliar a quantidade mínima de DNA que o sistema de PCR duplex era capaz de amplificar. Foram feitas diluições de fator 10, onde quatro µl de cada diluição foram adicionados nas reações.

Para avaliar a seletividade do teste, foram empregados padrões moleculares de 08 espécies virais diferentes.

#### 4.2.2 Fase 2- Produção do POP

A elaboração do Procedimento Operacional Padrão foi realizada em 3 etapas. A primeira consistiu em uma revisão narrativa acerca das leis, normas e instruções relacionadas à temática discutida, com o propósito de elucidar conceitos importantes na Gestão da Qualidade e definir os elementos integrantes de um POP; A segunda envolveu o contato com o Núcleo da Gestão da Qualidade do laboratório onde a técnica de PCR é empregada a fim de obter informações sobre a gestão documental, especialmente para obtenção do POP gerencial aprovado e empregado no local, assim como definição de conteúdo; e por fim a elaboração do POP técnico para o Diagnóstico da Infecção Genital pelos herpesvírus humano 1 e 2.

Por se tratar de uma revisão de literatura do tipo narrativa não há obrigatoriedade que os autores informem com detalhes os procedimentos ou critérios usados para selecionar e avaliar as referências incluídas na análise, pois a forma de seleção é variável e arbitrária. Segundo Cordeiro *et al.* (2007), este tipo de estudo tem como objetivo estruturar de forma mais ampla a percepção e discussão do tema pesquisado, raramente parte de uma questão específica, a sua preparação não exige critérios explícitos e sistemáticos, a busca das fontes não é pré-determinada e específica, sendo frequentemente menos abrangente.

Foi realizada uma revisão narrativa em periódicos na base de dados Scielo e em sites de busca como Google e Google acadêmico. Para traçar um direcionamento nas buscas foram realizadas a partir da utilização dos descritores: “qualidade”, “Gestão de qualidade”, “procedimento operacional padrão”.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Etapa 1- Otimização e validação da PCR duplex

Uma vez que o diagnóstico da infecção genital pelos herpesvirus, é predominantemente clínico, e o diagnóstico padrão-ouro é o isolamento viral, o método em questão é uma forma alternativa de diagnóstico, através do qual podemos identificar infecções latentes nos pacientes investigados. Desse modo, não foi possível obter amostras cérvico-uterinas previamente caracterizadas para o ensaio de validação da PCR. Inicialmente foram analisadas 46 amostras de DNA extraídos de espécime cérvico-uterinas provenientes do Biobanco do LabVir.

Todas as amostras extraídas foram submetidas à quantificação de material genético para avaliação da qualidade e integridade do DNA, onde constatou-se que as concentrações variaram de 1 a 88 ng/  $\mu$ l. A grande variabilidade de concentração nas amostras pode ser decorrente do método de obtenção/coleta do espécime clínico, uma vez que amostras cérvico-uterina são obtidas a partir de células de descamação da ecto e da endocérvice, o que naturalmente varia de um indivíduo para outro, bem como por influência de fatores do microambiente genital.

Com base nos dados de quantificação, as amostras foram divididas em 7 grupos/blocos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1- Quantificação de DNA das amostras cérvico-uterinas

| Quantidade de DNA<br>[ ] ng/ $\mu$ l | Número de<br>Amostras |
|--------------------------------------|-----------------------|
| 88-55                                | 4                     |
| 40-11                                | 8                     |
| 10-7                                 | 6                     |
| 6-5                                  | 6                     |
| 4                                    | 6                     |
| 3                                    | 8                     |
| 2-1                                  | 8                     |

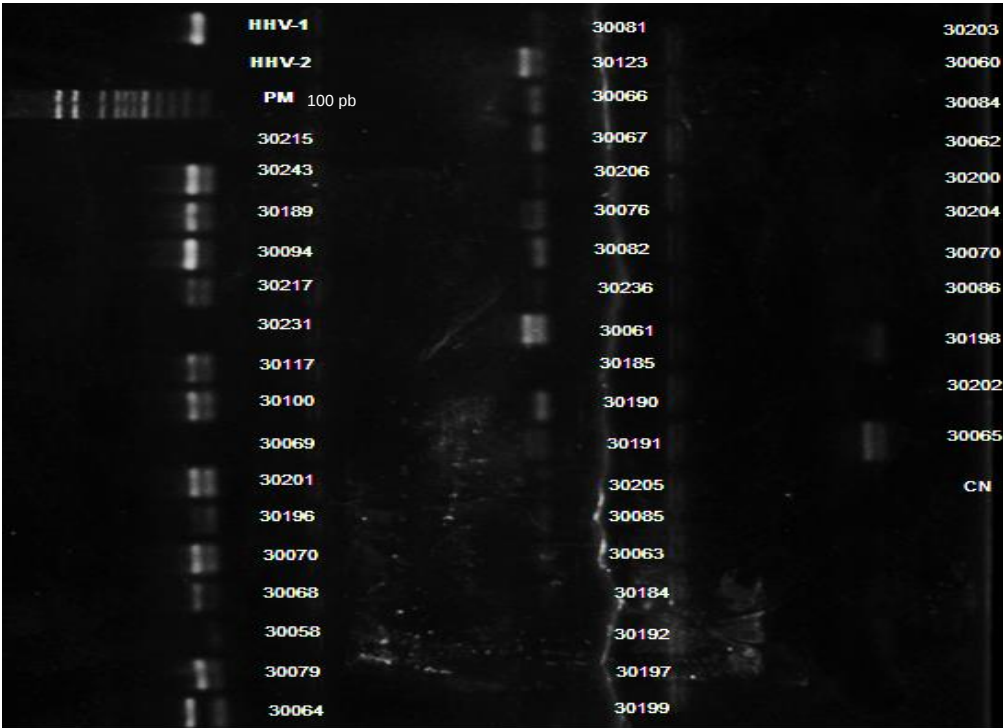
Fonte: Elaborado pela autora do trabalho.

Em seguida, todas as amostras foram submetidas a reação de PCR duplex pré-estabelecida, com o objetivo de fazer uma triagem inicial e encontrar amostras positivas para que estas fossem empregadas na otimização e validação. Em cada reação de PCR foram empregados controles negativos e controles positivos dos herpesvírus obtidos a partir de vírus isolados em cultura de células. Além disso, foi

utilizado como controle interno de amplificação (CIA) um segmento do gene *tnf alpha* o qual é expresso em células constitutivas, a fim de avaliar a ocorrência de resultados falso-negativos ocasionados por inibidores da PCR.

Das 46 amostras investigadas, 12 (26,08%) amplificaram o fragmento alvo de Herpesvírus humano 01 e 01 (2,17%) amostra amplificou o segmento do Herpesvírus humano 02. Desse modo, 13 amostras foram selecionadas e utilizadas para otimização e validação da PCR duplex (Figura 4).

Figura 4- Foto do gel de agarose a 2% com os produtos da PCR para pesquisa do HHV-1 e HHV-2 em amostras cérvico-uterinas, corado com brometo de etídio.



Fonte: Autora.

As amostras que apresentaram maior concentração de DNA foram as que mais amplificaram. Dentre as amostras positivas para HHV-1 as que apresentavam maior concentração foram as pertencentes aos blocos 1, 2 e 3 com concentração de 88-55, 40-11 e 10-7 ng/ µl, respectivamente.

A partir da seleção das amostras positivas e com base nos dados de quantificação, as amostras de DNA foram concentradas para a realização dos testes de limite de detecção. Para tal, adotou-se diluições seriadas nas escalas: 1:10, 1:50 e 1:100. Nesta etapa observou-se que o limite inferior de detecção na reação foi de

4ng de DNA (Figura 5).

Figura 5- Foto do gel de agarose a 2% com os produtos da PCR para pesquisa do HHV-1 e HHV-2 em amostras cérvico uterina diluídas, corado com brometo de etídio.



Fonte: Autora.

Afim de avaliar a repetitividade o teste foi aplicado repetidamente em múltiplas análises cegas, mantendo condições idênticas de amplificação, no LabVir. Nesta etapa, a concordância dos resultados foi de 100%. A reprodutibilidade do teste foi avaliada através da utilização de diferentes termocicladores onde a concordância dos resultados também foi de 100%.

A seletividade e especificidade da reação foi avaliada através da utilização de: (i) padrões moleculares provenientes de DNA extraído e purificado de vírus isolados; (ii) amostras positivas caracterizadas previamente, pertencentes ao biobanco do LabVir e; (iii) amostras negativas para o HHV-1 e HHV-2, caracterizadas previamente através do método padrão-ouro. Nesta etapa, utilizou-se

os vírus de DNA: *Papilomavírus humano*, *Epstein-barr*, *Poliomavírus* e *Herpesvírus humano* 3. No total, foram testadas 20 amostras (8 positivas para os vírus de DNA e 12 negativas para HHV-1 e 2 no padrão-ouro). Todos os padrões foram testados em duplicatas e não houve amplificação/detecção em nenhuma das amostras investigadas, o que confirma a especificidade dos primers empregados na reação.

A partir da validação deste ensaio, podemos inferir que o PCR duplex qualitativo é um método alternativo que representa uma poderosa ferramenta de detecção da infecção genital pelos *Herpesvírus humanos 1 e 2*. Porém, há necessidade da padronização deste protocolo para implementação da técnica a rotina do LabVir.

## **5.2 Etapa 2- Elaboração do POP**

### **Revisão Narrativa**

Desde a Revolução industrial o conceito de padronização já vem sendo relatado, pois com a substituição de força de trabalho humana pela energia mecânica, este processo tornou-se mais evidente, cujo objetivo era obter produtos mais idênticos, com aumento de produção e qualidade nos serviços. Então o significado da palavra padrão nos direciona para aquilo que serve como base ou norma, estando relacionado aos resultados a serem alcançados. E para prestar serviços de qualidade é necessário estabelecer padrões em que seja possível oferecê-los de forma segura e com qualidade (GUERREIRO *et al.*, 2008). Segundo Cruzeiro *et al.* (2016), atualmente a padronização está intimamente relacionada com a qualidade durante a gestão e operação das organizações. Para ele, a qualidade está presente no desenvolvimento dos processos técnicos e gerenciais e precisa ser definida e controlada e a padronização é instrumento base para esse controle. Por esse motivo, torna-se necessário compreender a construção desses conceitos a fim de entender o contexto no qual o procedimento operacional padrão (POP) está inserido.

O termo qualidade pode ser definido de acordo com a sua abordagem. Para Lima (2012), o conceito de qualidade normalmente é empregado para expressar a excelência de um produto ou de um serviço. Lobos (1991) afirma que a qualidade está relacionada ao processo pelo qual produtos ou serviços são materializados e se

este processo for bem realizado, o produto final terá qualidade. Então, a qualidade torna-se um fator importante e, saber administrá-la é estabelecer como serão executados os processos e métodos de forma padronizada. Na Gestão de qualidade cujo objetivo é fazer com que as empresas se organizem, com a finalidade de garantir produtos e serviços com qualidade, buscando que todos os envolvidos estejam satisfeitos, a qualidade é o objeto principal. Atualmente a série ABNT NBR ISO 9001, ABNT ISO/IEC 17025 e ABNT NBR ISO 15189, estão entre as principais normas para gestão e/ou garantia de qualidade disponíveis para instituições e laboratórios que realizam ensaios. Segundo a ISO 9000 (2015), uma norma é “um documento que fornece requisitos, especificações, diretrizes ou características que podem ser usadas consistentemente para garantir que os materiais, produtos, processos e serviços sejam adequados a sua finalidade.

A ISO 9001 tem seu objetivo no desenvolvimento de normas técnicas para aplicação mundial, possuindo grande representatividade no estabelecimento de padrões internacionais para a gestão. Nestas normas são estabelecidos requisitos que auxiliam na melhoria do processo do sistema de gestão de qualidade. As normas ISO são avaliadas a cada cinco anos, a fim de serem atualizadas e manterem-se relevantes para o mercado (CHAVES; CAMPELLO, 2015). A última versão da ISO, chamada de ISO 9001:2015 foi publicada em setembro de 2015, mas no Brasil, a organização de normalização que é representada pela associação Brasileira de Normas técnicas (ABNT) publicou uma semana depois. A ISO 9001:2015 no que se refere à informação documentada é bastante moderada nos requisitos de especificações detalhadas, nesta versão as empresas têm autonomia para decidir como querem documentar a sua informação.

A ABNT ISO/IEC 17025 tem finalidade de promover a confiança nas atividades exercidas por laboratórios, podendo ser estes de calibração de equipamentos ou de ensaios analíticos variados. De modo geral, esta norma garante que todas as etapas de uma análise possam ser rastreadas, independente da matriz analisada ou da determinação realizada, exigindo que o laboratório mantenha registros, procedimentos e documentos (LIMA; SCHECHTEL, 2019). Esta ISO exige que tudo relacionado ao laboratório seja devidamente documentado. Entretanto permite flexibilização na forma que será feita e organizada a documentação, pois não há como requisito a criação de um manual da qualidade para o laboratório.

A ISO 15189 é considerada o padrão mais relevante para a criação de um sistema de qualidade no laboratório clínico. Foi desenvolvida para que os laboratórios orientem os seus sistemas de gestão da qualidade no sentido da melhoria contínua, não só de serviços, mas também dos próprios resultados. O laboratório deve estabelecer, documentar, implementar e manter um sistema de gestão da qualidade e melhorar continuamente sua eficácia de acordo com os requisitos dessa norma. Dentre a documentação do sistema de gestão da qualidade deve incluir manual da qualidade e POP, documentos que favorecerão na qualidade do serviço (LIMA, 2018).

Além dos requisitos estabelecidos nas ISO's devem ser cumpridos também requisitos normativos específicos, por exemplo, as Resoluções da Anvisa. Segundo a Resolução de Diretoria colegiada (RDC) 63 de 25 de novembro de 2011 que dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de saúde todos os serviços públicos, privados, filantrópicos, civis ou militares e até mesmo os que exercem ações de ensino e pesquisa devem dispor de procedimento operacional padrão (POP).

Nesse contexto, se torna fundamental a padronização do processo por meio de um POP. Este é um documento onde se coloca a descrição detalhada de todas as medidas necessárias para a realização de uma tarefa e assim garantirem a seus usuários um serviço ou produto livre de variações indesejáveis na sua qualidade final. O POP destina-se a quem executa a tarefa, ele deve ser simples, claro, explicativo, atualizado e de acordo com o setor, para que possa ser interpretado por todos os colaboradores garantindo dessa forma maior segurança para todos, além de controlar gastos e economizar tempo (PEREIRA *et al.*, 2017).

De acordo com Medeiros (2010), POP é um documento onde se coloca a tarefa repetitiva do colaborador, na maneira e sequência que deve ser executada, nele contém: tarefa, executante, objetivo da tarefa, matérias necessários, processos, cuidados especiais, ações corretivas e aprovações. Ainda, conforme a autora, é essencial para uma organização à padronização das tarefas, pois é uma ferramenta que busca minimizar os erros na rotina de trabalho e faz com que cada colaborador tenha condições de executar sua tarefa sozinho e com qualidade.

Duarte (2005) considera o POP, independentemente de ser gerencial ou técnico, como parte de um manual de procedimento que uma empresa pode

desenvolver detalhando uma atividade para garantia da padronização de suas atividades assegurando aos seus usuários um serviço ou produto sem alterações indesejáveis na qualidade final. Para ele, como o POP é direcionado para quem executa a tarefa, este documento deve ser simples, completo e objetivo para favorecer o entendimento de todos que irão utilizá-lo.

Para Pereira (2017), através do POP é possível viabilizar procedimentos seguros embasados em evidências científicas, o que possibilita a confiabilidade do resultado final. Vieira (2014) afirma que elaborar um POP para uma gestão de qualidade é bastante significativo, evitando falhas possíveis através da normatização das atividades. O POP deve apresentar uma estrutura mínima, como data, definição, objetivo material utilizado, procedimento técnico, recomendações, responsabilidades, assinatura e referências (ROCHA, 2014). A revisão do POP deverá ocorrer anualmente ou de acordo com a necessidade do processo. Honório, Caetano e Almeida (2011) classificam os POPs como recurso tecnológico essencial, em busca de melhor resultado dos profissionais que realizam as atividades, sendo assim descrever cada etapa é necessário para garantir seu resultado relacionado com a técnica.

Desta forma, através da elaboração de um POP torna-se possível facilitar a realização das tarefas dentro dos seus processos. Com isso, todos que conseguirem o mesmo padrão atenuarão os erros de operação, o que é primordial para a qualidade dos resultados. Portanto, a criação do POP para detecção de infecção por herpesvírus teve como propósito estabelecer processo por meio da padronização e minimização de desvios na execução do teste.

#### Contato com a Gestão da Qualidade do LabVir

Foi disponibilizado o modelo de POP gerencial aprovado e utilizado pelo LabVir. Este modelo foi desenvolvido pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jacqueline Cortinhas, com intuito de definir os parâmetros para elaboração dos POPs utilizados no laboratório, garantindo dessa forma uma homogeneidade quanto ao formato dos documentos do LabVir.

Os documentos produzidos no laboratório permanecem ali, sem que seja utilizado até que passe pelo processo de avaliação e aprovação pela equipe técnica

do laboratório. E como o foco do POP desenvolvido neste trabalho é apenas a etapa de elaboração, este documento produzido ainda deverá passar pelos procedimentos de validação realizado pela equipe de Gestão de qualidade do LabVir. Somente após o parecer de aprovação da gestão é que o produto tecnológico desenvolvido poderá ser utilizado.

### Elaboração do POP

A construção deste POP foi realizada a partir da leitura de normas, POP gerencial estabelecido pelo LabVir-UFGA e associação com os resultados da técnica de PCR duplex empregada neste estudo. Durante a elaboração do POP a linguagem utilizada foi observada para que ela seja acessível a todos que irão ter acesso ao documento, porque ao escrever um POP deve-se pensar que ele está sendo elaborado para vários colaboradores com grau de instrução diferente, e a capacidade de entendimento destes muda. Então, na construção buscou-se uma linguagem simples, clara e com detalhes para que qualquer colaborador com acesso a este documento leia o POP, consiga executar a atividade descrita.

A legislação não nos dá uma estrutura padrão de formatação do POP, por exemplo, qual a margem, fonte, numeração das páginas, etc. Mas como este POP foi produzido segundo o POP gerencial do LabVir, estes itens foram definidos de acordo com o documento deste laboratório.

Dessa forma, o POP para o processo de detecção de infecção por herpesvírus humano, ficou estruturado com os elementos que o compõem como o cabeçalho, contendo o nome do laboratório; título do Procedimento Operacional Padrão; nome de cada um do (s) responsável (eis) pela elaboração, verificação, liberação e aprovação seguido do local de locação, data de cada uma destas etapas e respectiva rubrica; número de páginas do POP, indicando o status da página atual e do total de páginas do POP; revisão e emissão. A Figura representa o cabeçalho do procedimento operacional padrão conforme estabelecido pelo LabVir-UFGA. Ressaltando que o cabeçalho deve estar padronizado na primeira e demais páginas do documento.

Figura 6- Cabeçalho padrão do LabVir/UFPA

|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    |                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|  <b>INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-UFPA</b><br><b>LABORATÓRIO DE VIROLOGIA -LABVIR</b><br><b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b> |  | <b>POP LABVIR 1.1 - 001</b> |
|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | Revisão: 00                 |
|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | Página 1 de 10              |
|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | Data efetiva: 00/00/0000    |
| <b>Elaboração de Procedimento Operacional Padrão</b>                                                                                                                                                                      |                                                                                    |                             |
| Aprovado por: XXXXXXXX                                                                                                                                                                                                    | Comissão de Gestão da Qualidade                                                    | 00/00/0000                  |
| Liberado por: XXXXXXXX                                                                                                                                                                                                    | Função                                                                             | 00/00/0000                  |
| Verificado por: XXXXXXXX                                                                                                                                                                                                  | Função                                                                             | 00/00/0000                  |
| Elaborado por: Jacqueline Cortinhas                                                                                                                                                                                       | Função: Professora Adjunto                                                         | 30/08/2016                  |

Fonte: Cortinhas (2016).

Ainda na primeira página, logo abaixo do cabeçalho, é apresentado o sumário do POP, nesta seção há informação sobre os tópicos do documento, tais como: objetivo, campo de aplicação, definições, siglas, responsabilidades, procedimentos, referências, documentos complementares e histórico do documento. Vale lembrar que, a partir da primeira atualização, é necessário incluir o histórico de revisões do documento.

Por se tratar de POP técnico é necessário realizar a descrição do procedimento informando o método, tipo de amostra, material e equipamentos, soluções e reagentes, ou seja, o POP deve minimamente conter instruções sequenciais das execuções e sua frequência, pois existem várias formas de execução de uma atividade, então a descrição detalhada torna-se fundamental para que o procedimento seja executado de forma uniforme e com segurança.

Como ainda não foi submetido à equipe de gestão do laboratório para a sua avaliação, alguns itens como: aprovado, liberado, verificado e função de cada um não foram preenchidos, somente após avaliação desta gestão é que poderão ser preenchidos.

## 6. PRODUTO TÉCNICO-TECNOLÓGICO

|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    |                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|  <b>INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-UFPA</b><br><b>LABORATÓRIO DE VIROLOGIA -LABVIR</b><br><b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP</b> |  | <b>POP LABVIR 1.5 - 001</b>     |
|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | <b>Revisão: 00</b>              |
|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | <b>Página 1 de 13</b>           |
|                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                    | <b>Data efetiva: 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, ponteiros, 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 µM/mL ou 100pmol/µL, 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 (µM/mL) | Solução de trabalho (pmol/µL) |
|--------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 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<br>[mM/ $\mu$ L] | Solução de trabalho<br>[mM/ $\mu$ L] |
|-------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 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),  $Mg_2Cl_2$  (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 25 $\mu$ L contendo 14,5  $\mu$ L de água, 2,5  $\mu$ L 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 TaqDNA, 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                          |                                                               |
| Taq 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”)

- Ligar o termociclador na tomada de 220v;
- Na parte posterior do termociclador mova o botão liga/desliga na posição liga. Aguardar até aparecer o menu principal.
- Colocar os tubos de PCR dentro dos poços do termociclador
- 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.
- Selecionar o teste “*HHV*”; pressionar [Enter]
- 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]
- 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
- 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 LABVIR 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 homogeneizar. Deixar esfriar um pouco.

- 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](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

|                                                                                                                                                |                                                                                                                         |                                                                                    |                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p><b>LabVir</b><br/>Laboratório de Virologia (ICB/UFPA)</p> | <p><b>INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-UFPA</b><br/> <b>LABORATÓRIO DE VIROLOGIA -LABVIR</b><br/> <b>FORMULÁRIO</b></p> |  | <p><b>FOR LABVIR 07.00 - 000</b></p> <p><b>Revisão: 00</b></p> <p><b>Página 1</b></p> <p><b>Data efetiva: 12/04/2019</b></p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[illegible]

## FORMULÁRIO PARA PCR DUPLEX HHV-1/HHV-2

Nº da reação: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Responsável:\_\_\_\_\_ Segmento amplificado:\_\_\_\_\_

População:

## Preparo do MIX

Para 01 reação

Para reações

Água 14.5 µl

Água μl

|                  |        |
|------------------|--------|
| Tampão PCR (10X) | 2.5 µl |
|------------------|--------|

Tampão PCR (10X) μl

MgCl<sub>2</sub> [50mM] 0.7 μlMgCl<sub>2</sub> (50mM) μl

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Primer HHV-1F [10pmol/μl] | 0.5 μl |
|---------------------------|--------|

Primer \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_ pmol) μl

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Primer HHV-1R[10pmol/μl] | 0.5 μl |
|--------------------------|--------|

| Primer | ( pmol) | μl |
|--------|---------|----|
| 1      |         |    |
| 2      |         |    |
| 3      |         |    |
| 4      |         |    |
| 5      |         |    |
| 6      |         |    |
| 7      |         |    |
| 8      |         |    |
| 9      |         |    |
| 10     |         |    |
| 11     |         |    |
| 12     |         |    |
| 13     |         |    |
| 14     |         |    |
| 15     |         |    |
| 16     |         |    |
| 17     |         |    |
| 18     |         |    |
| 19     |         |    |
| 20     |         |    |
| 21     |         |    |
| 22     |         |    |
| 23     |         |    |
| 24     |         |    |
| 25     |         |    |
| 26     |         |    |
| 27     |         |    |
| 28     |         |    |
| 29     |         |    |
| 30     |         |    |
| 31     |         |    |
| 32     |         |    |
| 33     |         |    |
| 34     |         |    |
| 35     |         |    |
| 36     |         |    |
| 37     |         |    |
| 38     |         |    |
| 39     |         |    |
| 40     |         |    |
| 41     |         |    |
| 42     |         |    |
| 43     |         |    |
| 44     |         |    |
| 45     |         |    |
| 46     |         |    |
| 47     |         |    |
| 48     |         |    |
| 49     |         |    |
| 50     |         |    |
| 51     |         |    |
| 52     |         |    |
| 53     |         |    |
| 54     |         |    |
| 55     |         |    |
| 56     |         |    |
| 57     |         |    |
| 58     |         |    |
| 59     |         |    |
| 60     |         |    |
| 61     |         |    |
| 62     |         |    |
| 63     |         |    |
| 64     |         |    |
| 65     |         |    |
| 66     |         |    |
| 67     |         |    |
| 68     |         |    |
| 69     |         |    |
| 70     |         |    |
| 71     |         |    |
| 72     |         |    |
| 73     |         |    |
| 74     |         |    |
| 75     |         |    |
| 76     |         |    |
| 77     |         |    |
| 78     |         |    |
| 79     |         |    |
| 80     |         |    |
| 81     |         |    |
| 82     |         |    |
| 83     |         |    |
| 84     |         |    |
| 85     |         |    |
| 86     |         |    |
| 87     |         |    |
| 88     |         |    |
| 89     |         |    |
| 90     |         |    |
| 91     |         |    |
| 92     |         |    |
| 93     |         |    |
| 94     |         |    |
| 95     |         |    |
| 96     |         |    |
| 97     |         |    |
| 98     |         |    |
| 99     |         |    |
| 100    |         |    |

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Primer HHV-2F [10pmol/μl] | 0.5 μl |
|---------------------------|--------|

Primer \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_ pmol) \_\_\_\_\_  $\mu$ l

Primer HHV-2R[10pmol/μl] 0.5 μl

Primer \_\_\_\_\_ (\_\_\_\_\_ pmol) \_\_\_\_\_  $\mu$ l

|              |             |
|--------------|-------------|
| dNTPs [10mM] | 1.0 $\mu$ l |
|--------------|-------------|

dNTPs (\_\_\_\_ mM) \_\_\_\_\_  $\mu$ l

*Taq* DNA polimerase 0.3 μl

*Taq* DNA polimerase μl

DNA 4.0  $\mu$ l

Volume final 25  $\mu$ l

OBS: Programa HHV-1/2 (termociclador N° 03 e 04)

Ciclo de temperatura: 94°C/3min; (94°/30'';60°/30'';72°C/30'') x 40; 72°C/8min.

[illegible][illegible][illegible]

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A PCR duplex se mostra como uma alternativa muito atraente, visto que a combinação do teste em um único ensaio pode reduzir os requisitos de volume de amostra, tempo prático e tempo de liberação de resultado. Portanto, o teste aplicado neste trabalho pode ser usado como uma ferramenta para o diagnóstico em infecções genitais causadas por HHV-1 e HHV-2. Além disso, baseado nos levantamentos realizados sobre POP foi possível construir um modelo padrão para executar a técnica descrita neste estudo. Gerando desta forma um documento que deverá integrar a rotina das atividades da técnica em questão, chegando-se a um padrão de execução de máxima eficiência da mesma e com o mínimo de erro possível por parte do executante.

## REFERÊNCIAS

ACHESON, Nicholas. **Fundamentals of Molecular Virology**. 1. ed. Jhon Wiley & Sons Ltd. USA. Cap. 13, 2007.

BENEDETTI, Jacqueline; ZEH, Judith; COREY, Lawrence. Clinical reactivation of genital herpes simplex virus infection decreases in frequency over time. **Ann Intern Med**, v. 131, n.1, p. 14-20, 1999.

BERNSTEIN, David *et al.* Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. **Clin. Infectar. Dis.**, v. 56, n. 3, p.344-51, Feb 2013.

BOIVIN, Guy. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. **Herpes**, v. 2, suppl., p. 48-56, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC** nº 63, de 25 de novembro de 2011.

CAMPADELLI-FIUME, Gabriella. *et al.* Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. **Curr Opin Virol**, v.2, n.1, p. 28-36, Feb 2012.

CARROZZA, Michael; DELUCA, Neal. Interaction of the viral activator protein ICP4 with TFIID through TAF250. **Mol Cell Biol.**, v, 16,n. 6, p. 3085-93, Jun 1996.

CARVALHO, Andreia; ANCHIETA, Lêni; ROMANELLI, Roberta. Infecções congênitas por herpes-vírus. **Rev Med de Minas Gerais**, v. 24, n. 2, p. 223-232, Abr/Jun, 2014.

CHAVES, Silvana; CAMPELLO, Mauro. **A qualidade e a evolução das normas série ISO9000**. 2015. Disponível em <https://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos16/27224305.pdf>. Acesso em: 08. Jan. 2022.

CHAYAVICHITSILP, Pamela. *et al.* Herpes simplex. **Pediatr Rev**, v. 30, n.4, p.119-29, Apr 2009.

CLEATOR, Graham; KLAPPER, Paul. Herpes simplex In: **Principals & Praticce of clinical Virology**. Eds: Zuckerman, A.J., Barstuala, J.E., Pattison, J.R., Griffiths, P. D., Schuob, B.D. 5 ed., Jhon Wiley & Sons Ltd. UK. Cap. 2A, 2004.

COLLINS, P.; ELLIS, N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. **J Med Virol**, v.1, suppl.p. 58-66, 1999.

CONSOLARO, Alberto; CONSOLARO, Maria. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial**, vol.14, n.3, p.16-24, 2009.

CORDEIRO, Alexander *et al.* Revisão sistemática: uma revisão narrativa. **Rev. do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 34, n. 6, p. 428-431, nov./dez. 2007.

COREY, Lawrence. *et al.* The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 35, n. 5, p. 435-45, Apr 2004.

Cruzeiro, Daniela; BESSE, Letícia; SANTOS, Raquel. **Desenvolvimento de procedimento operacional padrão para uma empresa de extração e envase de água mineral**. Trabalho de Conclusão de Curso ( Bacharel em Administração) Faculdade G & P, Pederneiras, 2016.

CURTIN William *et al.* Midtrimester fetal herpes simplex-2 diagnosis by serology, culture and quantitative polymerase chain reaction. **Fetal Diagn Ther.**, v.33, n.2, p.133-6, Mar 2013.

DAIKOKU, Tohru. *et al.* Novel deletion in glycoprotein G forms a cluster and causes epidemiologic spread of herpes simplex virus type 2 infection. **J Med Virol**, v. 85, n. 10, p. 1818-28, Oct 2013.

DICKSON, N. *et al.* HSV-2 incidence by sex over four age periods to age 38 in a birth cohort. **Sex Transm Infect.**, v. 90, n. 3, p. 243-5, May 2014.

DUARTE, Renato Lima. **Procedimento Operacional Padrão - A Importância de se padronizar tarefas nas BPLC**. Curso de BPLC – Belém-PA/ 2005.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex labialis. **Clínical and experimental dermatology**, v. 32, n. 6, p. 625-630, Oct 2007.

FILÉN, Finn. *et. al.* Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection and Quantification of Herpes Simplex Virus Type 1 and Herpes Simplex Virus Type 2 in Genital and Cutaneous Lesions. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 31, n. 6, p. 331-336, Jun 2004.

GARBER, David; SCHAFFER, Priscilla; KNIPE, David. A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. **J Virol.**, v. 71, n. 8, p. 5885-93, Aug 1997.

GELLER, Mauro. *et al.* Herpes Simples: Atualização Clínica, Epidemiológica e Terapêutica. **J bras Doenças Sex Transm**, v.24, n.4, 260-66, 2012.

GOPAL, Robin. *et al.* A monoclonal blocking EIA for herpes simplex virus type 2 antibody: validation for seroepidemiological studies in Africa. **J Virol Methods**, v. 87, n.1-2, p.71-80, 2000.

GROVES, Mary. Genital Herpes: A Review. **American Family Physician**. v. 93, n. 11. p, 928-934. 1 Jun 2016.

GU, Baohua; DELUCA, Neal. Requirements for activation of the herpes simplex virus glycoprotein C promoter in vitro by the viral regulatory protein ICP4. **J Virol**, v.68, n. 12, p.7953-65, Dec 1994.

HANCOCK, Meaghan *et al.* Herpes simplex virus regulatory proteins VP16 and ICP0 counteract an innate intranuclear barrier to viral gene expression. **Virology**, v. 352, n. 1, p.237-52, Aug 2006.

HILL, Ann. *et al.* Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. **Nature**, v. 375, n.6530, p. 411-5, Jun 1995.

HONÓRIO, Rita; CAETANO, Joselany; ALMEIDA, Paulo Validação de procedimentos operacionais padrão no cuidado de enfermagem de pacientes com cateter totalmente implantado. **Revista Brasileira de Enfermagem** REBEn, Brasília, nº 64, 5, p. 802-809, dez, 2011. Disponível em: Acesso em: 08. Jan. 2022.

HOOK, Edward. A Recommendation Against Serologic Screening for Genital Herpes Infection What Now? In: (Ed.). **Jama. United States**, v.316, n. 23, p. 2493-2494, Dec 2016.

ICTV, 2018; ICTV 9th Report (2011) **Herpesviridae**. Disponível em: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae) Acesso em: 03/08/2019.

JAISHANKAR, Dinesh; SHUKLA, Deepak. Genital Herpes: Insights into Sexually Transmitted Infectious Disease. **Microb Cell**, v. 3, n. 9, p. 438-450, Sep 2016.

KOELLE, David; WALD, A. Herpes simplex virus: the importance of asymptomatic shedding. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 45, Suppl 4, p. 1-8, April 2000.

LANGENBERG, Andria *et al.* A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. Chiron HSV Vaccine Study Group. **Engl.J. Med**, v.341, n.19, p.1432-8, Nov 1999.

LEGOFF, J.; PÉRE, H.; BÉLEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Virology Journal**, v. 11, n. 83, p. 1-17, May 2014.

LIMA, Débora; SCHECHTEL, João. Atualização da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025, uma visão sobre as principais mudanças. **Fac. Sant'Ana em Revista, Ponta Grossa**, v. 5, nº 1, p. 3 6 - 4 7, 1. Sem. 2019 Disponível em: <https://www.iessa.edu.br/revista/index.php/fsr/index>. Acesso em: 09 Jan. 2022.

LIMA, Elza. **Gestão da Qualidade em Laboratórios** . Fortaleza: Ed Unichristus, 2018. 80p

LINDBERG, Anette; KREIVI, Jan-Peter. Splicing inhibition at the level of spliceosome assembly in the presence of herpes simplex virus protein ICP27. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 189-98, Mar 2002.

LOBOS Julio. **Qualidade através das pessoas**. São Paulo: Instituto da Qualidade, 1999.

LOOKER, Katharine *et al.* Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140765, 2015.

LUPI, Omar. Herpes Simples. **An Bras Dermatol**, v. 75, n. 3, p. 261-77, 2000.

LUPI, Omar. Prevalence and risk factors for herpes simplex infection among patients at high risk for HIV infection in Brazil. **International Journal of Dermatology**, v.50, n.6, p.709-13, Jun 2011.

LYCKE, Erik. The pathogenesis of the genital herpes simplex virus infection. **Scand J Infect Dis**, v. 80 Suppl. p. 7-14, 1991.

MA, Joel *et al.* Lytic Gene Expression Is Frequent in HSV-1 Latent Infection and Correlates with the Engagement of a Cell-Intrinsic Transcriptional Response. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 7, p. e1004237, Jul 2014.

MARSHALL, D.S *et al.* Identification of herpes simplex virus genital infection: comparison of a multiplex PCR assay and traditional viral isolation techniques. **Modern Pathology**, v. 14, n. 3, p. 152-6, Mar 2001.

MATHEW, Rani. *et al.* Herpes simplex virus 1 and 2 in herpes genitalis: A polymerase chain reaction-based study from Kerala. **Indian J Dermatol**, v.36, n. 6, p. 475-478, Nov-Dec 2018.

MCCORMACK, S. *et al.* Herpes Simples. In: Focaccia R, editor. 3 ed. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, p. 549-67, 2005.

MCGEOCH, Duncan; RIXON, Frazer; DAVISON, Andrew. Topics in herpesvirus genomics and evolution. **Virus Research**, v. 117, n. 1, p. 90-104, Apr 2006.

MEDEIROS, Tatiana **POP – Procedimento Operacional Padrão**: Um exemplo prático. 2010 Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Administração) Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, Assis, 2010.

METTENLEITER, Thomas; KLUPP, Barbara; GRANZOW, Harald. Herpesvirus assembly: an update. **Virus Research**, v. 143, n. 2, p.222-34, Aug 2009.

MILLER, Nancy *et al.* Comparative clinical evaluation of the IsoAmp® HSV assay with ELVISA HSV culture/ID/typing test system for the detection of

herpes simplex virus in genital and oral lesions. **Clin Virol**, v. 54, n. 4, p. 355-358, Aug 2021.

MIRANDA, M.M.F.S. Viroses dermatópicas. In NSO Santos, Romanos, M.T.V., Wigg, M.D., **Introdução a virologia humana** 1ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 75 – 85, 2002.

MIURA, TY. **Anotações da aula da Disciplina Microbiologia e Parasitologia**. UNIVILLE 2013. Disponível em: [https://aia1317.fandom.com/pt-br/wiki/Herpesv%C3%ADrus\\_humanos\\_%E2%80%93\\_HSV-1\\_e\\_HSV-2](https://aia1317.fandom.com/pt-br/wiki/Herpesv%C3%ADrus_humanos_%E2%80%93_HSV-1_e_HSV-2). Acesso em: 03 Ago. 2019.

MURALIDHAR, Sumathi. Molecular methods in the laboratory diagnosis of sexually transmitted infections. **Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS**, v. 36, n.1, p. 9-17, Jan-Jun 2015.

NAHMIAS, A.J.; DOWDLE, W.R. Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. Progress in medical virology. **Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale**, v.10, p.110-159, 1968.

NEVILLE, Brad *et al.* **Patologia: Oral & Maxilofacial**. 3. ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

OLIVEIRA, Márcia *et al.* Fundamentos teórico práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase – São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudeste**. 43 p. 2007.

O'TOOLE, Jennifer *et al.* Mutation of the protein tyrosine kinase consensus site in the herpes simplex virus 1 alpha22 gene alters ICP22 posttranslational modification. **Virology**, v. 305, n. 1, p.153-67, Jan 2003.

PELLET, Philip; ROIZMAN, Bernard. **Herpesviridae**. In K D.M., H R.M., Fields virology. 6. ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Pennsylvania, p. 2479–2499, 2013.

PEÑA, Kristen *et al.* Genital herpes simplex virus type 1 in women: detection in cervicovaginal specimens from gynecological practices in the United States. **J Clin Microbiol.**, v.48, n.1, p. 150-3, Jan 2010.

PENELLO, Angelo *et al.* Herpes genital. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2010.

PEREIRA, Lilian. *et al.* Avaliação de procedimentos operacionais padrão implantados em um serviço de saúde. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 24, n. 4, p. 47-51, Out 2017.

PEREIRA, Valeska *et al.* Herpes simplex vírus type 1 is the main causa of genital herpes in women of Natal, Brazil. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v.161, n.2, p.190-193, Apr 2012.

POL, Barbara *et al.* Type-Specific Identification of Anogenital Herpes Simplex Virus Infections by Use of a Commercially Available Nucleic Acid Amplification Test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3466 –3471, Nov 2012.

PRESTON, Chris. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. **J Gen Virol.**, v.81, n.1, p.1-19, Jan 2000.

RESENDE, F. **Avaliação e caracterização da actividade anti-herpética de extractos aquosos de plantas da flora portuguesa.** Mestrado em Microbiologia Aplicada. FCUL, 2021.

ROBERTS, Scot. *et al.* Direct correlation between a negative autoregulatory response element at the cap site of the herpes simplex virus type 1 IE175 (alpha 4) promoter and a specific binding site for the IE175 (ICP4) protein. **J Virol**, v. 62, n.11, p.4307-20, Nov 1988.

ROCHA, Francisca. **Manual de Procedimentos Operacionais Padrão de Enfermagem do Hospital Getúlio Vargas.** 2 ed. Teresina: HGV, 2014. 116 p.

ROIZMAN, Bernard *et al.* Herpes Simplex Viruses. In K D.M., H R.M., **Fields virology**. 5 ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Pennsylvania, p. 2502–2601, 2007.

ROIZMAN, Bernard *et al.* Herpes Simplex Viruses. In K D.M., H R.M., **Fields virology**. 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia - Pennsylvania, p. 1823–1897, 2013.

ROSSETI, Maria; SILVA, Cláudia; RODRIGUES, Jaqueline. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

SANDRI-GOLDIN, Rozanne; MENDOZA, Grace. A herpesvirus regulatory protein appears to act post-transcriptionally by affecting mRNA processing. **Genes Dev.**, v.6, n. 5, p. 848-63, May 1992.

SANTANA, Brayn. **Relatório de estágio – laboratório de desenvolvimento tecnológico em virologia – IOC/FIOCRUZ.** Título do Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária ) - Universidade de Brasília , Brasília. 2018.

SANTOS, Manuely *et al.* Herpesvírus humano: tipos, manifestações orais e tratamento Odontol. **Clín.-Cient.** Recife, v.11, n. 3, p. 191-196, 2012.

SEN, Jayita. *et al.* Herpes simplex virus US3 tegument protein inhibits Toll-like receptor 2 signaling at or before TRAF6 ubiquitination. **Virology**, v. 439, n. 2, p. 65-73, May 2013.

SMITH, Colton *et al.* ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. **J Virol**, v. 67, n.8, p. 4676-87, Aug 1993.

STRANG, Blair; STOW, Nigel. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. **J Virol**, v. 79, n.19, p.12487-94, Oct 2005.

SUAZO, Paula. *et al.* Herpes simplex virus 2 infection: molecular association with HIV and novel microbicides to prevent disease. **Med Microbiol Immunol**, v. 204, n. 2, p. 161-76, Apr 2015.

SUDENGA, Staci *et al.* Incidence, prevalence, and epidemiology of herpes simplex virus-2 in HIV-1-positive and HIV-1-negative adolescents. **Sex Transm Dis**, v. 39, n.4, p. 300-5, Apr 2012.

UMBACH, Jennifer *et al.* MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. **Nature**, v. 454, n. 7205, p. 780-3, Aug 2008.

USTAÇELEBI, Semsettin. Diagnosis of herpes simplex virus infections. **J Clin Virol**, v.21, n. 3, p.255-9, Jun 2001.

VAN ROOIJEN, Martijn *et al.* False-negative type-specific glycoprotein G antibody responses in STI clinic patients with recurrent HSV-1 or HSV-2 DNA positive genital herpes, The Netherlands. **Sex Transm Infect**, v. 92, n. 4, p. 257-60, Jun 2016.

VIEIRA, Karine. **A importância do procedimento operacional padrão como ferramenta na gestão de qualidade em uma clínica de nefrologia**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnólogo em Gestão hospitalar) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, Santa Catarina, 2014.

WALD, Anna *et al.* Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. **J Infect Dis**, v. 188, n. 9, p.1345-51, Nov 2003.

WALD, Anna *et al.* Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. **N Engl J Med**, v. 342, n.12, p. 844-850, Mar, 2000.

Wald, Anna.; Ashley-Morrow, Rhoda. Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. **Clin Infect Dis**, v. 35, Suppl 2, p. S173-82, Oct 2002.

WHO (World Health Organization). **Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana**. Brasília: OMS; Ministério da Saúde; 2013 . Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840\\_por.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840_por.pdf). Acesso em; 04. Ago.2019.

WHO (World Health Organization). **Herpes Simplex Virus**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/>. Acesso em: 03. Ago. 2019.

WHO (World Health Organization). **Sexually Transmitted Infections (STIs)**. Disponível em: <https://www.who.int/en/newsroom/factsheets/detail/sexuallytransmittedinfections>. Acesso em: 03. Ago.2019.

WIGG, Márcia *et al.* 2008. **Virologia humana**. 2 ed, Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 212-244.

XIA, Fan *et al.* Cost of Routine Herpes Simplex Virus Infection Visits to U.S. Emergency Departments 2006-2013. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n.4, p. 689-692, Jul 2018.

ZHU, Yaqi. *et al.* Ex vivo 2D and 3D HSV-2 infection model using human normal vaginal epithelial cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15267-15282, Feb 2017.