

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para processamento de material biológico				

Biobanco

Procedimento Operacional Padrão para:

**Processamento de Sangue**

POP: V. 1.0

Nome: Extração de DNA em sangue total

Data Efetiva: dezembro, 2012

autora: Erika Regina Manuli

Aprovação      Profa. Dra. Ester C. Sabino

Assinatura

data

Dra. Léa Campos de Oliveira

Assinatura

data

**Histórico de revisão**

Versão	Descrição	Revisado por	Data
1.0			



## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 2 de 12

<b>Código</b> IMT-POP-BB-003	<b>Data</b> <b>emissão</b> 17/12/2012	<b>Data</b> <b>vigência</b> 17/12/2012	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> 17/12/2014	<b>Versão</b> 01
<b>Assunto:</b> POP para processamento de material biológico				

### OBJETIVO

Este procedimento operacional padrão (POP) descreve como processar:

- sangue periférico obtido de pacientes para o fracionamento do mesmo para a obtenção de frações de soro, plasma, creme leucocitário e hemácias.
- outras amostras biológicas (fezes, urina, líquido amniótico, lavados e secreções e amostras de tecidos de biópsias)

### APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao manuseio de amostras biológicas de pacientes para os laboratórios participantes do Biobanco .

### DIVULGAÇÃO

Este POP é mantido em arquivo e uma cópia em papel com autorização do responsável pelo biobanco.

Uma cópia papel pode ser emitida pelo Responsável Documentação:

- desde que o nome da pessoa ou entidade destinatária desta cópia conste do quadro abaixo de Usuários Principais com a menção "Cópia papel";
- ou, em caso excepcional, com a prévia autorização do emitente deste POP.

### EMISSÃO, REVISÃO E APROVAÇÃO

Este POP foi:

- **Emitido por** : Erika R. Manuli
- **Revisado por** : Dra. Léa Campos de Oliveira
- **Aprovado por:** Profa. Dra. Ester C. Sabino

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para processamento de material biológico				

**USUÁRIOS PRINCIPAIS**

acesso	nome	área
Cópia Papel		
Cópia Papel		
Cópia Papel		
Cópia Papel		

**HISTÓRICO**

VERSÃO	DATA	PÁGINA	NATUREZA DA MUDANÇA
1	17/12/2012	1 a 6	Criação do documento



## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 4 de 12

<b>Código</b> IMT-POP-BB-003	<b>Data</b> <b>emissão</b> 17/12/2012	<b>Data</b> <b>vigência</b> 17/12/2012	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> 17/12/2014	<b>Versão</b> 01
<b>Assunto:</b> POP para processamento de material biológico				

### Princípio:

**Fracionamento de sangue:** são procedimentos técnicos que utilizam uma centrífuga para separação da parte líquida do sangue (soro e/ou plasma) das hemácias. Posteriormente, apenas com auxílio de micropipetas, faz-se a separação do material desejado.

**Outras amostras biológicas:** são procedimentos técnicos que utilizam uma centrífuga para separação de células de amostras de urina, secreções e lavados e de líquido amniótico, e manutenção de amostras de fezes e de material das biópsias.

**Aplicação:** Separação de frações do sangue (soro, plasma, creme leucocitário e hemácias) a partir de amostra sangue de sangue periférico e de células de amostras de urina, secreções e lavados e de líquido amniótico e manutenção de amostras de fezes e de material de biópsia

### Amostras:

- amostra de sangue total periférico, obtida a partir de coleta em tubo primário contendo o anticoagulante EDTA ou gel separador.
- outras amostras biológicas (fezes, urina, líquido amniótico, lavados e secreções e amostras de tecidos de biópsias)



## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 5 de 12

<b>Código</b>	<b>Data emissão</b>	<b>Data vigência</b>	<b>Próxima revisão</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para processamento de material biológico

### **Materiais e equipamentos**

Avental, máscaras, óculos de proteção e luvas Pipetas automáticas

Ponteiras de filtro estéril

Solução fisiológica salina estéril

Tubos de 1,5 mL a 2,0 mL estéreis

Tubos de coleta sangue a vácuo com anticoagulante EDTA

Tubos de coleta sangue a vácuo com gel separador -PPT

Tubos de coleta sangue a vácuo com gel separador

Criotubos de 0,5 mL

Gaze estéril

Caixas de armazenamento

Centrífuga de tubos de ângulo móvel

Centrífuga para microtubos

Banho-maria

Freezer -20° e -80°C

### **Reagentes e equipamentos**

Centrífuga de tubos

### **Cuidados básicos:**

#### **a. Coleta:**

- **sangue periférico:** após a coleta, inverter várias vezes o tubo contendo EDTA cuidadosamente para homogeneização.

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b>	<b>Data emissão</b>	<b>Data vigência</b>	<b>Próxima revisão</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para processamento de material biológico

Proceder a etapa de fracionamento do sangue.

O sangue deverá ser fracionado no momento da coleta, ou no caso de tubo com gel separador, poderá ser centrifugado para separação das hemácias e mantido a -20°C até o momento do fracionamento.

- **outras amostras biológicas (fezes, urina, líquido amniótico, lavados e secreções e amostras de tecidos de biópsias):** após a coleta, as amostras devem ser encaminhadas para o processamento imediatamente.

Proceder a etapa de fracionamento do sangue.

**b. Laboratório:****Materiais:**

Qualquer material utilizado deve ser previamente autoclavado e as superfícies das bancadas e suportes limpas com etanol 70%.

**Reagentes que devem ser preparados:**

Não há necessidade de utilização de nenhum reagente para estes procedimentos.

**Procedimentos****a) Obtenção de soro**

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b>	<b>Data</b>	<b>Data</b>	<b>Próxima</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para processamento de material biológico

1. Identificar os tubos primários com etiqueta de código de barras e os tubos de criopreservação que serão utilizados para o armazenamento dos soros.
2. Verificar os tubos primários com amostra de sangue visualmente para ver se houve a formação e retração do coágulo. Se o coágulo não tiver retraído, colocar o tubo a 37°C por 15min.
3. Centrifugar os tubos de gel separador por 10 min a 3000rpm à temperatura ambiente.
4. Retirar todo o volume de soro com auxílio de uma micropipeta transferindo 500µL de soro para cada tubo de criopreservação, etiquetados com etiquetas de código de barras correspondentes ao tubo primário. Descartar o tubo primário em coletor de material pérfuro-cortante.
5. Estocar as alíquotas de soro em freezer -20°C em caixas de armazenagem.

Obs.: a caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.

**b) Obtenção de plasma**

1. Identificar os tubos primários com EDTA ou com gel separador PPT, com etiqueta de código de barras e os tubos de criopreservação que serão utilizados para o armazenamento dos soros.



## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 8 de 12

<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para processamento de material biológico				

2. Centrifugar os tubos primários por 10 min a 3000rpm à temperatura ambiente.

3. Retirar todo o volume de plasma com auxílio de uma micropipeta transferindo 500µL de plasma para cada tubo de criopreservação, etiquetados com etiquetas de código de barras correspondentes ao tubo primário.

Obs.: proceder com muito cuidado quando tratar-se de tubo primário com EDTA para que a ponteira não toque as hemácias. Descartar o tubo primário em coletor de material perfuro-cortante, se for obter hemácia ou creme leucocitário da amostra cujo plasma foi separado.

4. Estocar as alíquotas de soro em freezer -80°C em caixas de armazenagem.

Obs.: a caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.

### **c) Obtenção de creme leucocitário**

1. Identificar os tubos primários com EDTA, com etiqueta de código de barras e os tubos de criopreservação que serão utilizados para o armazenamento dos soros.

2. Centrifugar os tubos com EDTA por 10 min a 3000rpm à temperatura ambiente.





## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 9 de 12

<b>Código</b>	<b>Data emissão</b>	<b>Data vigência</b>	<b>Próxima revisão</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para processamento de material biológico

3. Retirar os tubos da centrífuga com muito cuidado para não mexer o creme leucocitário (“nuvem branca” entre o plasma e as hemácias).
4. Retirar todo o volume de plasma com auxílio de uma micropipeta com muito cuidado para não tocar no creme leucocitário.
5. Com outra ponteira retirar toda a “nuvem branca” acima das hemácias e transferir para 1 tubo de criopreservação, etiquetado com etiqueta de código de barras correspondentes ao tubo primário.
6. Estocar as alíquotas em freezer -80°C em caixas de armazenagem.

Obs.: a caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.

### **d) Obtenção de hemácias**

1. Identificar os tubos primários com EDTA ou com gel separador PPT, com etiqueta de código de barras e os tubos de criopreservação que serão utilizados para o armazenamento dos soros.
2. Centrifugar os tubos primários por 10 min a 3000rpm à temperatura ambiente.
3. Retirar todo o volume de plasma com auxílio de uma micropipeta.
4. Nos tubos contendo EDTA, vortexar o tubo para homogeneizar bem as hemácias retirar todos o volume de hemácias com auxílio de pipeta Pasteur,

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b>	<b>Data emissão</b>	<b>Data vigência</b>	<b>Próxima revisão</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para processamento de material biológico

transferindo 1000µL de hemácias para cada tubo de criopreservação, etiquetados com etiquetas de código de barras correspondentes ao tubo primário. Descartar o tubo primário em coletor de material pérfuro-cortante.

5. Nos tubos de gel separador-PPT, após retirar todo o plasma, com auxílio da ponteira utilizada para esse procedimento, retirar o gel separador, enfiando-se a ponteira no gel e girando-a até o gel soltar-se do tubo e ficar aderido à ponteira.
6. Vortexar o tubo para homogeneizar bem as hemácias e retirar todo o volume de hemácias com auxílio de pipeta Pasteur, transferindo 1000µL de hemácias para cada tubo de criopreservação, etiquetados com etiquetas de código de barras correspondentes ao tubo primário. Descartar o tubo primário em coletor de material pérfuro-cortante
7. Estocar as alíquotas de hemácias em freezer -20°C em caixas de armazenagem.

Obs.: a caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.

**e) Obtenção de células (urina, líquido amniótico, secreções e lavados)**

1. Identificar os frascos com as amostras, com etiqueta de código de barras e os tubos de criopreservação que serão utilizados para o armazenamento dos mesmos.

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b>	<b>Data emissão</b>	<b>Data vigência</b>	<b>Próxima revisão</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para processamento de material biológico

2. Transferir os materiais para tubos tipo falcon de 15mL e centrifugar 15 min a 2000rpm à temperatura ambiente.
3. Retirar todo o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur, transferindo para 2 tubos de 5mL, deixando cerca de 500uL.
4. Homogeneizar o sedimento e transferir para um tubo de criopreservação, etiquetado com etiquetas de código de barras correspondentes ao frasco da amostra. Descartar o frasco com a amostra biológica em coletor de material perfuro-cortante.
5. Estocar as alíquotas de células a -80°C em caixas de armazenagem e a alíquotas dos sobrenadantes a -20°C..

Obs.: a caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.

**f) Manutenção de fezes e material de biópsia**

1. Identificar os frascos com as amostras, com etiqueta de código de barras e os tubos de criopreservação que serão utilizados para o armazenamento dos mesmos.
2. Transferir cerca 5g de fezes para um tubo tipo falcon de 15mL contendo 10ml de solução fisiológica estéril e vortexar para homogeneizar bem. Guardar o

**Procedimento Operacional Padrão - POP**

<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-003</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para processamento de material biológico				

material a -20°C. Para amostras de biópsias, transferir o material diretamente para um tubo de criopreservação e estocar a -80°C.

Obs.: a caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.