

TÍTULO TIPO: POP	EXAME MOLECULAR DE INFECTIVIDADE DE MOLUSCOS DO GÊNERO <i>Biomphalaria</i> PELA LS-PCR	CODIGO HMM-40
		CLASSIFICAÇÃO O SIGDA: 013.1

PALAVRA-CHAVE <i>Biomphalaria; DNA; EXAME; LS-PCR; Schistosoma mansoni</i>	REVISÃO 04
--	-----------------------------

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Documentos Associados
4. Definições
5. Siglas
6. Condições gerais
7. Procedimento
8. Responsabilidades
9. Avaliação da Bibliografia
10. Referências bibliográficas
11. Anexos
- A. PCR Específico.

1. OBJETIVO

Este procedimento fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos para o exame molecular de infectividade de moluscos do gênero *Biomphalaria* pela LS-PCR

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica e Moluscário Lobato Paraense.

ELABORADO AMANDA DOMINGUES DE ARAÚJO	VERIFICADO CRISTIANE LAFETÁ	APROVADO ROBERTA LIMA CALDEIRA	DATA	PÁGINAS 8
---	---------------------------------------	--	-------------	---------------------

3. DOCUMENTOS ASSOCIADOS

LHMM SR-02 Registro de Recebimento, Fixação, Codificação e Exame dos Invertebrados
 LHMM SR-04 Extração de DNA Pelo Kit Wizard a partir de Amostras Biológicas
 LHMM SR-06 Preparação do Gel de Poliacrilamida para Visualização do DNA
 LHMM SR-25 Reagentes e Soluções do Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica
 GQ-28 Paramentação e Conduta no Laboratório

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

5. SIGLAS

Água <i>nuclease free</i>	Água livre de nucleases
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
LS-PCR	Reação em cadeia da Polimerase em baixa estringência de anelamento
Taq	Enzima DNA <i>polimerase Thermusaquaticus</i>
U	Unidade
°C	Graus Celsius
mM	Milimolar
dNTP	Deoxynucleotidotrifosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
MgCl ₂ ⁺	Cloreto de magnésio
KCl	Cloreto de potássio
Tris-HCl	Tris – Ácido clorídrico
pH	Potencial Hidrogeniônico
ml	mililitro
Primer	“Iniciador”, seqüência de oligonucleotídeos complementar a uma região da fita molde
Mix	mistura
µL	microlitro

6. CONDIÇÕES GERAIS

6.1. Este procedimento envolve locais diferenciados para execução, portanto em cada etapa foi descrito o local apropriado para desenvolver o processo.

6.2. Os requisitos de biossegurança e conduta no laboratório devem ser seguidos de acordo com o GQ-28 tais como utilização de calça comprida, calçados fechados e baixos, jaleco de mangas compridas e luvas.

6.3. Os moluscos recebidos pelo LHMM (Pop-LHMM SR-02) com suspeita de estarem no período pré-patente da infecção poderão ser submetidos a esta técnica.

6.4. Para o exame molecular de infectividade de moluscos do gênero *Biomphalaria* é feito PCR de uma região repetitiva do DNA mitocondrial do *Schistosoma mansoni*. Todo o procedimento de exame molecular exige o uso de plásticos estéreis em cada etapa, não sendo permitida a reutilização destes. Para evitar contaminação, o laboratório utiliza um sistema de áreas individualizadas, sendo permitido apenas o fluxo de amostras na sequência descrita abaixo:

Área 1 (sala de mix PCR, capela de fluxo laminar) ► Área 2 (Extração de DNA, bancada para colocar DNA) ► Área 3 (Pós-PCR, sala de gel).

7. PROCEDIMENTO

7.1. Extração de DNA

A extração de DNA será realizada conforme o POP LHMM SR-04, sendo que ao invés da utilização de parte da região cefalopodal para a extração será utilizado o molusco inteiro sem a concha.

Este procedimento deverá ser feito na sala de Extração de DNA

7.2. PCR

Mix de PCR: (Este procedimento deverá ser feito na sala de Mix PCR – capela de fluxo laminar). As anotações para a PCR deverão ser feitas no Anexo A e anexadas diretamente no livro de registro.

7.2.1. Etiquetar um tubo (0,2 mL ou 0,5mL) para cada amostra a ser amplificada.

TÍTULO EXAME MOLECULAR DE INFECTIVIDADE DE MOLUSCOS
TIPO: POP DO GÊNERO *Biomphalaria* PELA LS-PCR

CÓDIGO
HMM-40

7.2.2. Fazer os cálculos para a reação de PCR seguindo os valores abaixo (valores de referência para uma amostra) e preencher todos os dados no Anexo A ou no livro de registro. As quantidades de todas as substâncias abaixo, exceto o DNA, devem ser multiplicadas pelo número de amostras mais 2 (margem de erro), e misturadas em um mesmo tubo ("mix" dos componentes da reação de PCR). Amostras de DNA controle deverão ser incluídas na PCR. Designam-se DNA controle amostras de *S. mansoni* e caramujos infectados e não infectados. Além disso, todos os experimentos deverão ter um controle negativo (sem adição de DNA).

Componentes e volumes para mix de PCR (quantidade para 1 reação de 25 µL):

Reagente	Volume por amostra	CONCENTRAÇÃO FINAL (reação de 25 µL)
Água (água <i>nuclease free</i> , estéril)	q.s.p. 25 µL	---
dNTP mix (10 mM):	0,5 µL	0,2 mM (cada)
10X PCR Buffer, – Mg	2,5 µL	1x
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL	1,5 mM
Primer ETTS1 (10,0 µM):	0,5 µL	0,2 µM
Primer ETTS2 (10,0 µM):	0,5 µL	0,2 µM
Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 unidades/µL): (pode ser utilizado de 1U a 30U)	0,25 µL	1,25 U/reação
DNA diluído	Varia	≤500 ng/reação

Componentes e volumes para mix de PCR (quantidade para 1 reação de 10 µL):

Reagente	Volume por amostra	CONCENTRAÇÃO FINAL (reação de 10 µL)
Água (água <i>nuclease free</i> , estéril)	q.s.p. 10 µL	---

TÍTULO EXAME MOLECULAR DE INFECTIVIDADE DE MOLUSCOS
TIPO: POP DO GÊNERO *Biomphalaria* PELA LS-PCR

CÓDIGO
HMM-40

dNTP mix (10 mM):	0,2 µL	0,2 mM (cada)
10X PCR Buffer, – Mg	1,0 µL	1x
MgCl ₂ (50mM)	0,3 µL	1,5 mM
Primer ETTS1 (10,0 µM):	0,2 µL	0,2 µM
Primer ETTS2 (10,0 µM):	0,2 µL	0,2 µM
Platinum™ Taq DNA Polymerase (5 unidades/µL): (pode ser utilizado de 1U a 30U)	0,1 µL	1,25 U/reacção
DNA diluído	Varia	≤500 ng/reacção

ATENÇÃO!

Observar **sempre** a concentração dos reagentes, especialmente dos *primers* utilizados para o MIX de PCR. Para uma reacção de 25 µL: quando o primer estiver na concentração de 50mM utilizar um volume de 0,1 µL para cada amostra a ser amplificada; caso o primer esteja a 10 mM, utilizar um volume de 0,5 µL.

7.2.2.1. Sequência dos primers:

Sequência do primer ER: (5'-ACCTACCGTACTATGACG 3')

Sequência do primer EF: (5'-GGTTTCTTAGTGTTATAGCC3')

7.2.3. Descongelar totalmente todos os reagentes acima, fazer o mix dos componentes da reacção de PCR e alíquotá-lo nos tubos já etiquetados (na cabine de fluxo laminar dentro da sala de MIX), colocando o volume total do mix menos o volume do DNA *template* diluído que será adicionado posteriormente, na Sala de Extração. A solução contendo o mix que sobrar no tubo será utilizada como controle negativo de reacção, sem adição de DNA na sala de Extração.

7.2.4. Passo opcional: para termocicladores sem aquecimento na tampa, cobrir o mixalíquotado com uma gota de óleo mineral (para Biologia Molecular) e levar os tubos para a área designada para colocar DNA.

7.3. Inserção do DNA no PCR: (Este procedimento deverá ser feito na sala de Extração de DNA – bancada designada para colocar DNA no PCR).

TÍTULO EXAME MOLECULAR DE INFECTIVIDADE DE MOLUSCOS
TIPO: POP DO GÊNERO *Biomphalaria* PELA LS-PCR

CÓDIGO
HMM-40

7.3.1. Fazer uma diluição 50X do DNA a ser utilizado: retirar 1,0µL do DNA estoque (extraído conforme POP LHMM SR-04, com a modificação citada neste POP item 7.1) e transferir para outro tubo etiquetado contendo 49 µL de água (água *nuclease free* ou MilliQ® autoclavada).

7.3.1.1. A diluição do DNA pode ser diminuída ou aumentada de acordo com a quantidade ou concentração do DNA estoque.

7.3.2. Inserir o DNA diluído ao mix da PCR. Tampar o tubo, vortexar por 5 segundos e transferi-lo pela janela para a sala de gel. A quantidade de DNA *template* pode variar de acordo com a concentração do DNA estoque; seguir a tabela do item 7.2.2 para fazer o cálculo do mix.

7.3.3. Na sala de gel, centrifugar o tubo por 3 segundos a 13.000 RPM.

7.4. Amplificação do DNA: (Este procedimento deverá ser feito na sala de gel – Pós-PCR).

7.4.1. Colocar os tubos na máquina de PCR (termociclador) preferencialmente quando a temperatura atingir temperaturas superiores a 75°C no programa que contém os seguintes ciclos:::

- 1 - 95°C por 3 minutos
- 2 - 40°C por 1 minuto
- 3 - 72°C por 1 minutos
- 4 - 95°C por 45 segundos
- 5 - 34 vezes do passo 2
- 6 - 40°C por 45sec
- 7 - 72°C por 5 minutos
- 8 - Final

7.4.2. Após a amplificação, deve-se visualizar o DNA em gel de Poliacrilamida conforme POP LHMM SR-06.

Após a visualização do DNA em gel de poliacrilamida os resultados obtidos devem ser comparados com os perfis espécie-específicos, de *Schistosoma mansoni* de acordo com Jannotti-Passos, 1997.

8. RESPONSABILIDADES

Profissionais e colaboradores devidamente treinados para este fim.

TÍTULO EXAME MOLECULAR DE INFECTIVIDADE DE MOLUSCOS
TIPO: POP DO GÊNERO *Biomphalaria* PELA LS-PCR

CÓDIGO
HMM-40

9. AVALIAÇÃO DA BIBLIOGRAFIA

A bibliografia foi revisada e não há necessidade de alteração.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

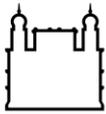
MANIATIS T, FRISTCH EF, SAMBROOK J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor publications, Cold Spring Harbor, New York.

JANNOTTI-PASSOS LK, VIDIGAL THDA, DIAS-NETO E, PENA SDJ, SIMPSON AJG, DUTRA WO, SOUZA CP, CARVALHO-PARRA JF 1997. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. J. Parasitology 83(3): 395-399.

11. ANEXOS

/ANEXO A

ANEXO A



TÍTULO EXAME MOLECULAR DE INFECTIVIDADE DE MOLUSCOS
TIPO: POP DO GÊNERO *Biomphalaria* PELA LS-PCR

CÓDIGO
HMM-40

LS-PCR

LS-PCR

DATA: _____ **RESPONSÁVEL:** _____ **NÚMERO:** _____
INICIADORES / CONCENTRAÇÃO:
MÁQUINA: ()Maq 1: LAB 1300459 ()Maq 2: LAB 7011174 ()Maq 3:10020429 ()Maq: _____
PROGRAMA: LS-PCR **CAPELA DE FLUXO LAMINAR:** ECC1300473
AMOSTRA: [Concentração] →

COMPONENTES	LOTE	VAL	MIX (<u> </u> μL)	PIPETAS
Água:				
Primer 1:				
Primer 2:				
dNTPs:				
Tampão:				
MgCl ₂ :				
Platinum™ Taq DNA Polymerase				
DNA				

Óleo mineral:
OBJETIVO:

HMM-40 Anexo A Rev04

CÓPIA NÃO-CONFIDENCIAL