



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Sheila Medeiros dos Santos Pereira

**ELABORAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA PADRONIZAÇÃO
E SISTEMATIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PARA
RECEBIMENTO DE DEPÓSITO DE NOVAS AMOSTRAS NA
COLEÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DA FIOCRUZ**

**Rio de Janeiro
2019**



Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho -IBCCF



Sheila Medeiros dos Santos Pereira

**Elaboração de protocolos para padronização e
sistematização dos procedimentos para recebimento de
depósito de novas amostras na coleção de Protozoários da
FIOCRUZ**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Formação Técnica para pesquisa Biomédica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Formação para Pesquisa Biomédica.

**Orientador(es): Maria Cristina Machado Motta
Claudia Masini d'Avila Levy
Co-orientador: Helena Lúcia Carneiro Santos**

**Rio de Janeiro
2019**

Ficha catalográfica

Pereira, Sheila Medeiros dos Santos.

Elaboração de protocolos para padronização e sistematização dos procedimentos para recebimento de depósito de novas amostras na coleção de protozoários da FIOCRUZ./ Sheila Medeiros dos Santos Pereira. – Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2019.

270 f.: il.; 30 cm.

Orientadoras: Maria Cristina Machado Motta e Claudia Masini d'Avila Levy.

Coorientadora: Helena Lúcia Carneiro Santos.

Dissertação (mestrado) – UFRJ / IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica, 2019.

Referências: f. 84-93.

1. Primatas- parasitologia. 2. *Macaca fascicularis*. 3. *Macaca mulatta* 4. *Saimiri sciureus*. 5. Biodiversidade. 6. Kinetoplastida. 7. Conjuntos de Dados como Assunto. 8. Formação para a Pesquisa Biomédica- tese. I. Motta, Maria Cristina Machado. II. Levy, Claudia Masini d'Avila. III. Santos, Helena Lúcia Carneiro. IV. UFRJ/ IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica. V. Título

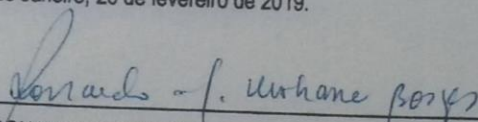
"Elaboração de protocolos para padronização e sistematização dos procedimentos para recebimento de depósito de novas amostras na coleção de Protozoários da FIOCRUZ"

SHEILA MEDEIROS DOS SANTOS PEREIRA

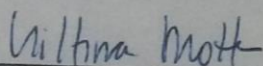
DISSERTAÇÃO DE Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2019.

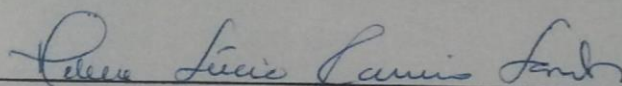


DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR - UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE Mestrado Profissional de Formação para Pesquisa Biomédica)

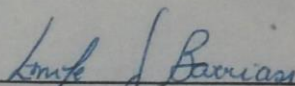


DRA. MARIA CRISTINA MACHADO MOTTA (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR

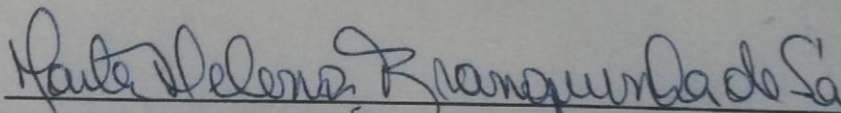
DRA. CLAUDIA MASINI D'AVILA LEVY (DOUTOR - FIOCRUZ) - 2º ORIENTADOR



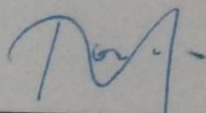
DRA. HELENA LUCIA CARNEIRO SANTOS (DOUTOR - FIOCRUZ) - COORIENTADOR



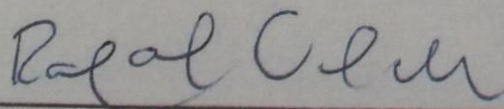
DRA. EMILE SANTOS BARRIAS (DOUTOR - INMETRO) - REVISOR



DRA. MARTA HELENA BRANQUINHA DE SÁ (DOUTOR - UFRJ)



DRA. ROSANE SILVA (DOUTOR - UFRJ)



DR. RAFAEL RAMOS HOSPODAR FELIPPE VALVERDE (DOUTOR - UFRJ)

DEDICATÓRIA

**A minha família, sem eles nada
disso seria possível**

AGRADECIMENTOS

À minhas orientadoras Dra. Claudia Masini d'Avila Levy e Dra. Maria Cristina Machado Motta, pela orientação, auxílio principalmente no final da dissertação, estímulo e por todo o aprendizado durante esta caminhada científica. À minha terceira orientadora, Dra Helena L. Carneiro Santos pela confiança, paciência e imenso incentivo à pesquisa, pelas incontáveis contribuições durante a realização desta dissertação.

À Deus e aos meus pais José Francisco e Teresinha, meus eternos incentivadores, pelo amor e apoio incondicionais e aos meus irmãos André, Paulo e José, que estão sempre vibrando com cada conquista minha.

Ao meu marido e filhos pela compreensão das horas extras no laboratório.

À Dra. Karina Mastropasqua Rebello pela paciência, pela amizade, colaboração científica e imensa ajuda com a elaboração dessa dissertação.

Aos meus amigos Rhagner Bonono, Amanda R. Caetano e Vitor Vidal da Coleção de Protozoários, pela amizade e divertida convivência desde o início do mestrado.

A toda equipe do Laboratório de Estudos Integrados a Protozoologia pela amizade eterna, pela ótima convivência e pela ajuda no desenvolvimento desta dissertação.

À minhas queridas madrinhas Cethura e Ismene pelo incentivo e pelo carinho.

Agradeço a todos que me incentivaram e ajudaram nesta caminhada.

Agradeço ao Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges, coordenador do mestrado profissional em Formação Técnica para a Pesquisa Biomédica, e em seu nome a todo quadro de funcionários do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho pela oportunidade proporcionada.

Agradeço ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite, diretor do Instituto Oswaldo Cruz, e em seu nome a todo quadro de funcionários do Instituto Oswaldo Cruz, pelo incentivo à formação continuada e a oportunidade de realizar este mestrado profissional.

Agradeço à Dra. Claudia Masini d'Avila-Levy, e em seu nome à toda equipe do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia e da Coleção de Protozoários, por concordar e apoiar com esta empreitada em paralelo com minhas atribuições como técnica da Coleção. Sem o apoio de todos, esta jornada teria sido impossível.

Agradeço às agências de fomento que permitiram a execução das etapas práticas do trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

EPÍGRAFE

“ Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim. ”

Francisco Candido Xavier

RESUMO

PEREIRA, Sheila Medeiros dos Santos: Elaboração de protocolos para padronização e sistematização dos procedimentos para recebimento de depósitos de novas amostras na coleção de Protozoários da FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2019. Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As coleções biológicas são repositórios estáticos de organismos ou parte deles, preservados *ex-situ*, são fundamentais para a pesquisa científica. A manutenção da integridade e da qualidade dos centros repositórios requer a padronização e a sistematização dos processos de depósito de amostras, levando em consideração as peculiaridades de cada acervo. O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo padrão de recebimento de novas amostras de protozoários na Coleção da Fiocruz (COLPROT). A base desta investigação foi a biodiversidade parasitológica de primatas não humanos. Para tanto, foi realizada a padronização do fluxograma de trabalho da COLPROT e a elaboração de 30 procedimentos operacionais padrão (POPs), consolidados por meio da obtenção de novos isolados de protistas. Um total de 60 amostras de fezes e de sangue de primatas não humanos (PNHs) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) foram utilizadas. Amostras foram obtidas de *Macaca fascicularis* (19), de *Macaca mulatta* (30) e de *Saimiri sciureus* (11). As amostras foram inicialmente inoculadas em meio de cultura rico, e uma vez positivas, eram submetidas ao processo de axenização, clonagem e criopreservação. Para a identificação dos isolados foi realizada a caracterização morfológica, e ultraestrutural empregando técnicas de microscopia óptica, fluorescência, e eletrônica varredura e transmissão. Para a caracterização molecular, foi realizada a amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU-rRNA na porção V7V8) e da glicossomal-Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (gGAPDH), seguida da reação de sequenciamento e análise filogenética. Todas as amostras de sangue analisadas foram negativas. Das 60 amostras de fezes analisadas em cultivo, seis foram positivas para microrganismos flagelados, sendo que apenas três mantiveram-se viáveis em cultura. Estes novos isolados foram depositados no acervo da COLPROT. O primeiro isolado (AG137-1/COLPROT774) foi identificado como *Bodo* sp. e o segundo isolado (SS17/COLPROT841) como *Cholamonas* sp. Por sua vez, para o isolado (AG137-2/COLPROT773), não obtivemos o status taxonômico, pois a sequência obtida para o alvo 18S apresentou um percentual de identidade de 94% com alguns protozoários da ordem Cercomonadida. Desta forma, a análise da diversidade de protozoários em PNHs propiciou a elaboração dos protocolos padrões para a COLPROT. Os resultados obtidos mostram que o nosso entendimento sobre a biodiversidade de microrganismos flagelados eucarióticos é subestimado e que existe um grande desafio quanto as abordagens de identificação de espécies. Este estudo contribuiu para elevar o padrão de qualidade da Coleção de Protozoários da Fiocruz através de um tripé: qualificação do corpo técnico, formalização de procedimentos operacionais padrão e enriquecimento do acervo através da obtenção de novos isolados que representam unidades taxonômicas inéditas.

Palavras chave: Caracterização morfológica e ultraestrutural, caracterização molecular, Kinetoplastea, Procedimentos Operacionais Padrão (POPs), Primatas Não-Humanos.

ABSTRACT

PEREIRA, Sheila Medeiros dos Santos: Protocols elaboration for the standardization and systematization of the procedures for deposit of new samples at Fiocruz protozoa collection. Rio de Janeiro, 2019. Master's Dissertation presented to the Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Biological collections are static repositories of organisms or parts of them preserved *ex-situ*, which are fundamental for scientific research. The maintenance of the integrity and quality of the repositories centers demands standardization and systematization of the procedures, for sample deposits, taking into account the peculiarities of each collection. The present study aimed to establish a standard protocol for new protozoa samples deposit at Fiocruz Protist Collection (COLPROT), as a survey case, we investigated the parasitological biodiversity in non-human primates. The COLPROT workflow was standardized and 30 standard operating procedures (POPs) were established, which were consolidated through the acquisition of new protist isolates. A total of 60 stool and blood samples from non-human primates (PNHs) were used from the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB / Fiocruz). Of these, 19 samples were obtained from *Macaca fascicularis*, 30 from *Macaca mulatta* and 11 samples from *Saimiri sciureus*. Samples were screened by inoculation in rich growth media, and positive samples were subjected to axenization, cloning, and cryopreservation. For identification of isolates, we performed morphological and ultrastructural characterization using optical (fluorescence) and electron microscopy (scanning and transmission). In addition, the molecular characterization was performed by DNA amplification through Polymerase Chain Reaction (PCR) of the Small Subunit of ribosomal RNA (SSU-rRNA region V7V8) and glycosomal-Gliceraldehide-3-phosphate Dehydrogenase (gGAPDH), the amplified fragments were Sanger-sequenced, and phylogenetic analysis were performed. All blood samples analyzed were negative and from the 60 stool samples kept in culture, six were positive for flagellated microorganisms and just three were maintained in culture. These new isolates were deposited at COLPROT collection. The first isolate (AG137-1/COLPROT774) was identified as *Bodo* sp. and the second isolate (SS17/ COLPROT841) as *Cholamonas* sp. The isolate AG137-2/COLPROT773 was not identified to the genus level because the sequence obtained for the 18S target showed a percentage identity of 94% with some protozoa of order Cercomonadida. In this way, the analysis of diversity provided a very solid ground for the elaboration of standard protocols for COLPROT. Thus, the biodiversity screening in PNHs allowed the elaboration and standardization of protocols. The results obtained illustrated that biodiversity of flagellated eukaryotic microorganisms is underestimated and there is a great challenge regarding the approaches for species identification. This study contributed to raising the quality standard of the Protozoa Collection of Fiocruz through: qualification of the technical staff, the establishment of standard operating procedures and enrichment of collection by obtaining isolates that represent unpublished taxonomic units.

Key words: Morphological and ultrastructural characterization molecular characterization, Kinetoplastea, non-human primates, standard operating procedures

LISTA DE SIGLAS/ABREVIações

- BOD - *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Química do Oxigênio)
- BLAST - *Basic local alignment search tool* (Ferramenta de busca por alinhamento local básico)
- BSA - Soro de albumina bovino
- CaCl₂ - Cloreto de cálcio
- CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- COLPROT – Coleção de Protozoários da FIOCRUZ
- COX1 - Citocromo oxidase 1
- DAPI - 4',6 – diamidino 2- fenil-indol
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*- Ácido etileno diamino tetracético
- EPF – Exame parasitológico fecal
- DIC - *Differential Interference Contrast* (Contraste interferencial diferencial)
- DMSO - *Dimethyl sulfoxide* - Dimetil sulfóxido
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfato
- gGAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HCl - Ácido clorídrico
- H₂O MilliQ - Água deionizada
- IB – Inferência Bayesiana
- ICTB - Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos
- KCl - Cloreto de potássio
- kDNA – DNA do cinetoplasto
- LIT- *Liver Infusion Tryptose* – Infusão de Fígado e Tryptose
- MET- Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV- Microscopia eletrônica de varredura
- MgCl₂ – Cloreto de magnésio
- MgSO₄ – Sulfato de magnésio
- ML – Máxima verossimilhança
- NaCl – Cloreto de sódio
- NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
- NaHPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
- NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico

NNN – *Nicolle Novy-Neal* - meio de cultivo composto por 1 parte de sangue de carneiro desfibrinado e 1 parte de meio de LIT suplementado com 10% de soro fetal.

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PBS - *Phosphate buffered saline* -solução salina tamponada composta por 10mM tampão fosfato e 0,15M NaCl)

PNHs- Primatas não humanos

POP – Procedimento operacional padrão

rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossomal

RNA – *Ribonucleic acid* - ácido ribonucleico

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

SFB – Soro fetal bovino

SSU-RNA - *Small subunit ribosomal RNA* (subunidade menor do RNA ribossomal)

TBE – Tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da classificação taxonômica da classe Kinetoplastea.....	32
Figura 2: Ilustração da ordem Trypanosomatida com alguns gêneros e seus respectivos hospedeiros.....	33
Figura 3: Componentes intracelulares do <i>Bodo</i> sp.....	35
Figura 4: Microscopia Eletrônica Transmissão de <i>Bodo</i> sp.....	37
Figura 5: Classificação taxonômica dos primatas não humanos.....	39
Figura 6: Distribuição geográfica dos primatas no velho mundo.....	40
Figura 7: Localização geográfica do <i>Saimiru sciureus</i> no Brasil.....	41
Figura 8: Foto de um primata não-humano da espécie <i>Macaca mulatta</i>	42
Figura 9: Foto de um primata não-humano da espécie <i>Macaca fascicularis</i>	42
Figura 10: Foto de um primata não-humano da espécie <i>Saimiri sciureus</i>	43
Figura 11: Isolado AG 137-1 corado com Giemsa.....	58
Figura 12: Micrografias do isolado de AG137-1.....	59
Figura 13: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados pelos iniciadores gGAPDH e 18S.....	61
Figura 14: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados pelo iniciador universal de eucarioto para 18S (EukA/B)	61
Figura 15: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados pelo iniciador universal de cinetoplastídeos para 18S (Kineto).....	62
Figura 16: Montagem da sequência consenso dos alvos SSU-rRNA para o isolado AG137-1.....	63
Figura 17: Árvore filogenética da sequência parcial do gene 18S.....	64
Figura 18: Árvore filogenética baseada na análise da sequência parcial do gene gGAPDH.....	65
Figura 19: Microscopia óptica do isolado AG 137-2 corado com Giemsa.....	66
Figura 20: Micrografias do isolado AG 137-2.....	67
Figura 21: Microscopia óptica do isolado SS17 corado com Giemsa.....	68
Figura 22: Micrografias do isolado SS17.....	69
Figura 23: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados para o alvo 18S por diferentes oligonucleotídeos iniciadores.....	71
Figura 24: Árvore filogenética baseada na análise da sequência parcial do gene 18S.....	73
Figura 25: Fluxograma organizacional de trabalho das amostras.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coleções existentes na FIOCRUZ.....	26
Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas neste estudo.....	52
Tabela 3: Dados obtidos das amostras de fezes coletadas e analisadas.....	55
Tabela 4: Ciclos de ampliações para os alvos SSu-rDNA e gGAPDH.....	60
Tabela 5: Percentuais de identidades do isolado AG 137-1 obtido por meio da ferramenta BLAST/NCBI.....	63
Tabela 6: Resultados obtidos nas PCRs empregando diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores	70
Tabela 7: Ciclos de temperaturas das PCRs após a etapa de padronização das reações.....	71
Tabela 8: Percentuais de identidades do isolado AG137-2 e SS17 obtido por meio da ferramenta BLAST/NCBI.....	72

SUMÁRIO

Lista de siglas/abreviações	11
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	14
I. INTRODUÇÃO	18
I. OBJETIVOS	19
2. 1 Objetivo geral.....	19
2. 2 Objetivos específicos.....	19
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
A) Breve história das coleções biológicas e sua relevância para preservação da biodiversidade.....	20
B) Coleções microbiológicas.....	24
C) Procedimentos das coleções microbiológicas.....	26
D) A Coleção de Protozoários da FIOCRUZ – COLPROT.....	29
E) Classe Kinetoplastea.....	31
F) Primatas não humanos (PNH).....	37
IV. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Validação do fluxograma do processo de obtenção de isolados feito na Coleção de Protozoários/FIOCRUZ.....	45
4.2 Amostragem.....	45
4.3 Meio de cultura.....	46
4.3.1 <i>Liver Infusion Tryptose</i> (LIT).....	46
4.3.2 <i>Nicolle Novy-Neal/Liver Infusion Tryptose</i> (NNN/LIT)	46
4.3.3 Schneider.....	46
4.4 Triagem de cinetoplastídeos nas amostras.....	47
4.4.1. Cultivo a partir de sangue de PNHs.....	47
4.4.2. Preparo e cultivo da amostra fecal.....	47
4.5 Processo de axenização, clonagem e criopreservação das culturas positivas.....	48
4.6 Caracterização morfológica dos isolados.....	49
4.6.1. Microscopia Óptica.....	49
4.6.2. Microscopia de Fluorescência.....	50
4.6.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
4.6.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	50
4.7. Identificação molecular dos isolados.....	51
4.7.1. Extração do DNA.....	51
4.7.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	51
4.7.3. Análise do produto amplificado por eletroforese.....	53
4.7.4. Reação de sequenciamento, alinhamento e análises filogenéticas.....	53
4.8. Depósito dos isolados na Coleção de Protozoários da FIOCRUZ.....	54
4.9. Procedimentos operacionais padrão (POPs).....	54

V. RESULTADOS	55
5.1 Diagnóstico parasitológico dos esfregaços sanguíneos e das fezes de PNHs.....	55
5.2 Isolamento de protozoários e estabelecimento de cultivos.....	56
5.3 Padronização do processo de criopreservação dos isolados.....	56
5.4 Padronização da técnica de coloração dos protozoários isolados.....	57
5.5 Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular do isolado AG137-1 (COLPROT774)	57
5.5.1 Caracterização morfológica.....	57
5.5.2. Caracterização molecular.....	60
5.6 Caracterização morfológica e ultraestrutural do isolado AG137-2 (COLPROT773)	66
5.7 Caracterização morfológica e ultraestrutural do isolado SS17 (COLPROT841)	68
5.8 Caracterização molecular dos isolados AG137 e SS17.....	70
5.9 Padronização do processamento de novos depósitos.....	73
VI. DISCUSSÃO	75
VII. CONCLUSÃO	83
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
IX. ANEXOS	94
1. Sequências parciais dos genes 18S e de gGAPDH <i>Bodo</i> sp. (AG 137-1) (COLPROT773)	94
2. Sequências parciais do gene SSU-rDNA <i>Cholamonas</i> sp. (SS17) (COLPROT841)	100
3. Sequência parcial do gene SSU-rDNA do Isolado AG137-2 (COLPROT774)	103
4. Procedimentos Operacionais Padrões.....	106
5. POP-COLPROT 001 Fluxograma de trabalho.....	107
6. POP-COLPROT 002 Inativação do soro fetal bovino	113
7. POP-COLPROT 003 Mensuração do pH com pHmetro	116
8. POP-COLPROT 004 Soluções de HCl e NaOH	121
9. POP-COLPROT 005 Meio de cultivo LIT	125
10. POP-COLPROT 006 Meio de cultivo NNN	131
11. POP-COLPROT 007 Descontaminação do isolado no meio de cultura	136
12. POP-COLPROT 008 Isolamento de Hemoprotozoário	142
13. POP-COLPROT 009 Isolamento de protozoários de material fecal.....	145
14. POP-COLPROT 010 Giemsa tamponado	149
15. POP-COLPROT 011 Criopreservação com glicerol	155
16. POP-COLPROT 012 Criopreservação com DMSO	159
17. POP-COLPROT 013 Criopreservação com metanol	163
18. POP-COLPROT 014 Tampão Fosfato Salino (PBS)	167
19. POP-COLPROT 015 Diluição seriada	171
20. POP-COLPROT 016 Contagem na câmara de Neubauer.....	176

21. POP-COLPROT 017 Preparação do DAPI para microscopia de Fluorescência	185
22. POP-COLPROT 018 Preparação do material biológico para microscopia eletrônica e de varredura	191
23. POP-COLPROT 019 Extração de DNA	197
24. POP-COLPROT 020 Reação da cadeia polimerase – Alvo gGAPDH.....	203
25. POP-COLPROT 021 Reação da cadeia polimerase – alvo 18S V7/V8	209
26. POP-COLPROT 022 Reação da cadeia polimerase – alvo18S KINETO 80/651.....	215
27. POP-COLPROT 023 Reação da cadeia polimerase – alvo 18S KINETO 14/2026	221
28. POP-COLPROT 024 Reação da cadeia polimerase – alvo 18S EUKA/EUKB	227
29. POP-COLPROT 025 Reação da cadeia polimerase – alvo 18S LSU 25/1440.....	233
30. POP-COLPROT 026 Reação da cadeia polimerase – alvo 18S LSU 1275/689	239
31. POP-COLPROT 027 Reação da cadeia polimerase - alvo SSU18S	245
32. POP-COLPROT 028 Eletroforese em gel de agarose para análise de DNA	251
33. POP-COLPROT 029 Purificação de DNA	262
34. POP-COLPROT 030 Sequenciamento de DNA	267

I. INTRODUÇÃO

As coleções biológicas são repositórios estáticos de organismos ou parte deles, preservados *ex-situ*, que são fundamentais para pesquisa científica. Estes repositórios impulsionam os estudos de saúde pública, o desenvolvimento científico/tecnológico, atividades de ensino e a elaboração de intervenções estratégicas a conservação da biodiversidade (PEIXOTO *et al.*, 2006). A manutenção da integridade e da qualidade dos centros repositórios é uma tarefa que requer a padronização dos processos, levando em consideração as peculiaridades de cada acervo (SAYÃO L. F. *et al.*, 2009). Para os acervos microbiológicos, é necessário a utilização de técnicas operacionais que se iniciam com a etapa de aquisição da amostra até a identificação acurada dos organismos e sua preservação. Este processo perpassa pelas etapas de triagem inicial, isolamento, cultivo, identificação morfológica e molecular, criopreservação e catalogação das informações, que culmina com o tombamento da amostra e de atribuição de um número de inventário, que obriga a instituição a garantir sua preservação, assim como a disponibilização dos dados em catálogo *on-line* para a comunidade científica (CANHOS D. A. L. *et al.*, 2006). Toda esta organização é o que diferencia coleções de trabalho de acervos institucionais, as primeiras em laboratório, já as últimas representam repositórios institucionais.

A coleção de protozoários da FIOCRUZ (COLPROT) é um repositório institucional que tem buscado a aprimoração da excelência dos serviços oferecidos à comunidade científica. Assim, a busca pela gestão da qualidade perpassa pela sistematização e padronização de um protocolo geral para o fluxo de trabalho da COLPROT, que vá desde as etapas iniciais de isolamento de novos protozoários e o depósito de amostras até a disponibilização de novos espécimes. Desta forma, este estudo tem como objetivo principal a investigação da biodiversidade parasitológica de primatas não humanos (PNHs) como modelo para a estruturação de um fluxograma de trabalho a ser utilizado para a montagem e organização da coleção de protozoários da FIOCRUZ. Nesse sentido, três produtos principais foram gerados: (i) novos conhecimentos sobre a diversidade de protozoários em primatas não-humanos; (ii) a obtenção e caracterização de novos isolados para incrementar o acervo da COLPROT; (iii) a implementação de gestão da qualidade através do estabelecimento e padronização de protocolos operacionais padrão para o fluxo de

trabalho da COLPROT, abrangendo desde o isolamento, caracterização, preservação e depósitos de novas amostras.

Assim, pretendemos agregar valores de excelência à COLPROT por meio da gestão da qualidade do acervo e da educação continuada e permanente da equipe da COLPROT, estruturas fundamentais e de extrema significância para um acervo institucional de qualidade.

II. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

- ✓ Sistematizar e padronizar um protocolo padrão para a coleta e identificação de novas amostras para a coleção de Protozoários da FIOCRUZ (COLPROT), tendo como base a investigação da biodiversidade parasitológica de primatas não humanos (PNHs).

2.2– Objetivos específicos

- ✓ Produzir procedimentos operacionais padrão (POPs) dos procedimentos necessários utilizados para a construção do POP de coleta e identificação de novas amostras para a coleção de Protozoários (COLPROT).
- ✓ Realizar o diagnóstico parasitológico e de esfregaços sanguíneos em PNHs.
- ✓ Realizar a triagem de protozoários sanguíneos e de material fecal em PNHs, através da semeadura em meio de cultura LIT, NNN/LIT e Schneider.
- ✓ Estabelecer os cultivos axênicos das amostras positivas para flagelados eucarióticos.
- ✓ Padronizar o processo de criopreservação dos isolados empregando diferentes criopreservadores.
- ✓ Padronizar a técnica de coloração dos protozoários isolados baseado em protocolos descritos na literatura.
- ✓ Clonar os novos isolados por meio de diluição seriada.
- ✓ Caracterizar os protozoários isolados através da amplificação e sequenciamento dos genes da subunidade menor do RNA ribossomal, da região V7/V8 (SSU-rRNA) e da glicossomal-Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (gGAPDH).
- ✓ Comparar as sequências de DNA obtidas, através de *BLAST*, com as disponíveis no banco de dados públicos (*Genbank* e *TriTrypDB*).

- ✓ Realizar inferências filogenéticas com as sequências obtidas, utilizando as sequências disponíveis nos bancos de dados públicos.
- ✓ Analisar a morfologia e a ultraestrutura dos protozoários isolados por microscopia óptica, de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.
- ✓ Elaborar um documento organizacional que traduza o fluxo do trabalho na COLPROT, por meio do estabelecimento e publicação de procedimento operacional padrão (POP).

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A) Breve história das coleções biológicas e sua relevância para preservação da biodiversidade

No planeta Terra, estima-se que exista cerca de milhões de espécies de organismos que ainda não foram descritas. Espécimes biológicas vêm sendo continuamente colecionadas há quase três séculos em diversas instituições de ensino e pesquisa, e é apenas uma ínfima parte de toda a diversidade estimada no planeta (GONZALEZ, 2010).

No início do século XIX, durante suas expedições, aventureiros e comerciantes coletavam exemplares de plantas e animais. Estes exemplares eram enviados aos centros europeus para alimentarem as curiosidades e estimularem o imaginário da nobreza. No decorrer deste mesmo século, a biodiversidade planetária, que possui como uma unidade básica a espécie, expandiu-se significativamente, através das rotas de navegação entre o Novo e o Velho Mundo, com o comércio marítimo. A associação feita entre os museus de história natural e o estudo da biodiversidade não parou de se estreitar e de se fortalecer no decorrer dos anos seguintes (ZAHER & YOUNG, 2003).

Durante o século XX, as coleções biológicas, fossem elas zoológicas, botânicas ou microbianas, foram implementadas nas diversas instituições científicas, onde os repositórios estáticos de informação e a catalogação de novos espécimes serviram de base para a taxonomia. Com essas novas informações, essas instituições passaram a formar uma rede, que têm uma representatividade ainda pequena frente à biodiversidade do planeta (ZAHER & YOUNG, 2003).

O Brasil ocupa um território que abriga entre 15% e 20% de toda a diversidade biológica mundial (PEIXOTO *et al.*, 2006). Essa diversidade ganha ainda maior valor

quando devidamente organizada, identificada, classificada, documentada e disponibilizada para acesso, sempre que houver demanda, seja ela para pesquisa ou para aplicações tecnológicas (SILVA *et al.*, 2011; SILVA & ROMERO SÁ, 2016).

No sistema de classificação dos seres vivos, podemos definir espécie (palavra antiga do século XIII que aponta sempre para uma coletividade, que vem do latim *species*), como sendo uma unidade taxonômica básica, um conjunto de populações de indivíduos morfologicamente semelhantes e que podem cruzar entre si, gerando descendentes férteis, sendo regularizada por genes específicos (NEVES *et al.*, 2011). Com relação a definição de espécime, é uma palavra mais recente (século XIX) que se refere a um indivíduo dentro dessa coletividade, do latim *specimen*, "amostra, prova" é "qualquer indivíduo de uma espécie". Os estudos das propriedades de uma população da espécie e subespécies é representada por uma amostra, isto é, por um espécime (NEVES *et al.*, 2011). Esta é provavelmente a parte mais problemática de quaisquer (re)descrições de espécie/gênero (VOTYPKA *et al.*, 2015).

O local ideal para arquivar materiais desse tipo e que são abertas aos cientistas são os museus ou coleções institucionais governamentais. Até meados do século passado, um dos principais problemas encontrados para a manutenção das amostras era sua preservação em coleções pessoais. Alguns desses colecionadores doavam suas amostras para museus ou instituições similares. Com isso, se evitou que diversos exemplares fossem perdidos (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2016). Entretanto, um levantamento nas publicações científicas especializadas em tripanossomatídeos, um dos focos deste trabalho, revelou que entre os anos 2000 e 2015, um total de 50 novas espécies foram descritas, das quais, apenas seis foram formalmente depositadas em museus ou coleções institucionais governamentais. Para mudar este panorama, deveria ser feita uma demanda sistemática pelos editores de revistas científicas para depósito em tais coleções de referência, a cada vez que recebessem para publicação artigos contendo a descrição de novas espécies. De fato, a entrada de um material em uma coleção institucionalizada ou um museu implica na atribuição de um número de inventário, que obriga a instituição a garantir sua preservação (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2016).

Existem diferentes tipos de coleções de culturas: coleções de trabalho, coleções institucionais ou coleções de serviço e coleções de referência (CANHOS V. & VAZOLLER R., 2005).

As coleções de trabalho são resultantes de projetos de pesquisas pautados nos estudos da biodiversidade. O pesquisador responsável exerce a função de curadoria de uma maneira informal, sem apoio institucional. Por sua vez, as coleções institucionais seguem as regências das normativas e regras, bem como, fomentos da instuição afim. As coleções de referência também são capitaneadas por uma instituição, com a obrigatoriedade da acreditação por órgãos nacionais e internacionais independente, especializados em normas técnicas (CANHOS V. & VAZOLLER R., 2005).

A identificação de uma espécie depende de uma base comparativa de dados e de conhecimento. As coleções devem ser centros pró-ativos na pesquisa e na preservação da biodiversidade. A construção do conhecimento sobre biodiversidade é necessariamente coletiva. O estudo da biodiversidade, sua conservação e o seu uso sustentável requer um tratamento multi e interdisciplinar, além de um ambiente de colaboração global (CANHOS *et al.*, 2015; DIEULIIS *et al.*, 2016).

Portanto, as coleções são muito mais do que uma mera constatação de determinados organismos no passado, elas representam um repositório em permanente procura por informações a respeito de espécies ou amostras e uma busca de conhecimento por diferentes disciplinas e áreas de estudo para valorizar e garantir a preservação do acervo (CANHOS & VAZOLLER, 2005). E principalmente, os museus e coleções biológicas institucionalizadas representam, através de missão institucional, a garantia de preservação dos acervos para gerações futuras.

A Federação Mundial de Coleções de Cultura (WFCC) é composta por Comitês, Comissões e Federações (COMCOF) da União Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) e um membro científico da União Internacional de Ciências Biológicas (IUBS). A WFCC tem como principal objetivo a promoção e o desenvolvimento de coleções de culturas de microrganismos e células cultivadas. Além de estimular o estabelecimento de novas coleções. A WFCC tem focado nas atividades de coleta, de cultura e, na melhoria dos padrões de qualidade dos serviços científicos prestados à comunidade internacional (WFCC, 2010).

Em 2001, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) introduziu uma nova concepção para centros repositórios. O papel das coleções ganhou notoriedade frente a biotecnologia mundial. Os centros repositórios foram definidos como partes essenciais da infra-estrutura que sustenta a biotecnologia (OECD, 2007). Todavia, a sustentação da biotecnologia perpassa pela

manutenção de coleção de alto nível de estringência em relação a qualidade. Desta forma, institui-se um guia de boas práticas baseado nas diretrizes da WFCC.

Várias coleções internacionais têm buscado excelência na qualidade dentre elas: Coleção Alemã de Microrganismos e Células (DSMZ), Coordenação Belga de Coleções de Microrganismos (BCCM); Coleção de Culturas do Reino Unido (UKNCC), com vários membros dentre os quais a Coleção Nacional de Bactérias Fitopatogênicas (NCPFB); Centro de Biodiversidade de Fungos (CBS), Holanda; Coleção Francesa de Bactérias Fitopatogênicas (CFBP), Angers; Centro de Recursos Biológicos do Instituto de Pesquisa RIKEN, Tsukuba, Japão; Coleção Americana de Culturas Tipo (ATTC), Estados Unidos (WCFF, 2010).

No Brasil, notoriamente, a visibilidade das coleções adveio após a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e o Desenvolvimento (ECO-92) realizada no Rio de Janeiro, Brasil, onde estabeleceu-se a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB). Trata-se de diretrizes alicerçadas em três princípios: na conservação da diversidade biológica (ecossistemas, espécies e recursos genéticos), o uso sustentável da biodiversidade e a repartição justa e equitativa dos benefícios provenientes da utilização dos recursos genéticos. Assim, o governo brasileiro promulgou as diretrizes para a Política Nacional de Biodiversidade por meio do decreto (decreto 2.519 de 16.03.98) com base na CDB. A política nacional brasileira reconhece que o conhecimento, conservação e o uso sustentável da biodiversidade são os ingredientes básicos para as necessidades ligadas à biodiversidade em ciência e tecnologia (OECD, 2007). Esta iniciativa propicia a redução das lacunas de conhecimento taxonômico e fomenta a formação de taxonomistas e curadores para as coleções. Posteriormente, em 2002, uma nova iniciativa brasileira foi a elaboração do Sistema de Informações para Coleções (SICOL). Este sistema reuni informações *on-line* sobre coleções de culturas de microrganismos. O usuário pode, de forma dinâmica, integrar os dados de linhagens de microrganismos disponíveis nas coleções nacionais e cruzar esses dados com informações de diretórios taxonômicos (Specieslink 2000), literatura científica (Scielo e PubMed) e bancos de dados genômicos (GenBank), agregando valor ao material biológico disponível nas coleções brasileiras (CANHOS & VAZOLLER, 2005).

Recentemente, foi regulamentada, no Brasil, a lei nº 13.123 de Maio de 2015, sobre a diversidade biológica brasileira que dispõe novas regras para o acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional do país. Esta lei promulga itens

sobre os bens, direitos e obrigações para a conservação e o uso sustentável da biodiversidade nos ecossistemas e habitats brasileiros. As instituições de pesquisa e seus pesquisadores são obrigados a registrar e a depositar em coleções biológicas qualquer material que seja enviado para o exterior (LEI, N° 13.123, 2015).

B) Coleções microbiológicas

Microrganismos e materiais biológicos diversos têm sido historicamente preservados e distribuídos por coleções de culturas microbiológicas. Através dos microrganismos podemos produzir variados produtos biotecnológicos, incluindo fármacos, alimentos, bebidas alcoólicas e ácidos orgânicos. Nas práticas avançadas de incubação de resíduos tóxicos, os microrganismos são utilizados no saneamento ambiental. Além disso, são aplicados na fixação biológica do nitrogênio e no controle de pragas na agricultura (RODRIGUES E. *et al.*, 1999). Por sua vez, no contexto educacional, as coleções são os alicerces por possuírem um valioso material para as atividades de ensino, auxiliando nas aulas práticas, estimulando a curiosidade dos alunos, ajudando na compreensão dos conhecimentos teóricos e contribuindo para a formação dos acadêmicos (FREIRE P., 2011; MARANDINO M. *et al.*, 2014).

As coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais. Essas coleções têm uma ampla gama de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (CANHOS D. A. L. *et al.*, 2006).

As coleções de culturas são centro de conservação possuindo um acervo de microrganismos cultiváveis e que tem como missão coletar organismos relevantes para estudos científicos e que devem satisfazer os elevados padrões de qualidade e especializações de boa conduta exigidos pela comunidade científica. Para isso, a preservação e a manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir a sua viabilidade, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando as suas características (ABREU & TUTUNJI, 2008).

A evolução das coleções de repositórios estáticos para dinâmicos são uma resposta ao aumento das demandas científicas. A ordem bem conhecida Trypanosomatida contém a maioria das espécies catalogadas da classe Kinetoplastea, incluindo aquelas que são relevantes para a saúde pública, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* sensu latu, e *Leishmania* spp. Alguns

exemplos ilustram o papel essencial das coleções biológicas para a pesquisa parasitológica. Estudos sobre antigos restos humanos mudaram a teoria amplamente aceita de que a origem da doença de Chagas em humanos, tenha ocorrido há aproximadamente 8000-6000 anos atrás. A alta prevalência de *T. cruzi* em populações nas múmias dessecadas, algumas tão antigas quanto 9000 anos, indicaram que a doença de Chagas é provavelmente tão antiga quanto a presença humana nas Américas. Outro exemplo que ilustra a relevância de coleções para investigação científica foi a identificação da causa da rápida extinção dos ratos endêmicos em uma ilha (ilhas Christmas, Austrália) após a chegada de ratos de pelos pretos. Havia a hipótese de que os ratos endêmicos eram susceptíveis ao tripanossomatídeo *Trypanosoma lewisi*, que infectava as pulgas presentes nos ratos de pelos pretos, que eram resistentes a esse parasito. A análise molecular de ratos endêmicos antes e após a chegada dos ratos de pelos pretos, preservados em coleções, confirmou que o parasito só prevaleceu nos ratos endêmicos após a entrada da nova população de ratos (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2016).

Portanto, as respostas que os acervos podem fornecer muitas vezes são inimagináveis no momento de tombamento das amostras, e é imprescindível a preservação das amostras que deve ser feita de forma a garantir a viabilidade, a estabilidade e a pureza do material, conservando as características genéticas e as propriedades morfológicas/fisiológicas.

No Brasil, a Fundação Oswaldo Cruz é uma das primeiras instituições que promove a formação de coleções biológicas, vide a tabela 1.

As coleções biológicas da FIOCRUZ seguem a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 que diz sobre requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Definindo a estrutura organizacional e gerencial até a qualificação do corpo técnico. (ABNT, 2017).

Tabela 1. Coleções existentes na Fiocruz:

Coleções Biológicas	Coleções existentes na FIOCRUZ
Coleção Microbiológicas	<ul style="list-style-type: none"> - Coleção de Bactérias da Amazônia - Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde - Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária - Coleção de <i>Campylobacter</i> - Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar - Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos - Coleção de Culturas do Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatos - Coleção de Enterobactérias - Coleção de Fungos da Amazônia - Coleção de Fungos Patogênicos - Coleção de Fungos de Referência em Vigilância Sanitária - Coleção de <i>Leptospira</i> - Coleção de <i>Leishmania</i> - Coleção de <i>Listeria</i> - Coleção Micológica de <i>Trichocomaceae</i> - Coleção de Protozoários - Coleção de <i>Trypanosoma</i> de Mamíferos Silvestres Domésticos e Vetores - Coleção de <i>Yersinia pestis</i>
Coleções Zoológicas	<ul style="list-style-type: none"> - Coleção de Artrópodes Vetores Ápteros de Importância em Saúde das Comunidades - Coleção de <i>Ceratopogonidae</i> - Coleção de <i>Culicidae</i> - Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz - Coleção de Flebotomíneos - Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz - Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz - Coleção de Simulídeos do Instituto Oswaldo Cruz - Coleção de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz - Coleção de Vetores da Doença de Chagas - Coleção de Malacologia Médica - Coleção de Mosquitos Neotropicais
Coleção Botânica	- Coleção Botânica de Plantas Medicinais
Coleções Histopatológicas	<ul style="list-style-type: none"> - Coleção da Seção de Anatomia Patológica - Coleção de Febre Amarela - Coleção do Departamento de Patologia

C) Procedimentos das coleções microbiológicas

Alguns procedimentos específicos para a aquisição, manutenção e distribuição de espécimes são exigidos nas coleções. Esses procedimentos devem ser implementados e devem alcançar as boas práticas laboratoriais para que as culturas estejam viáveis, puras e autenticadas. As linhagens microbianas resultam em uma quantidade significativa de informações decorrentes

das atividades de rotina e de pesquisa. Sua identificação ocorre inicialmente através de provas bioquímicas, seguidas de técnicas moleculares, que ajudam a resolver problemas taxonômicos relacionados à caracterização e à identificação de novos táxons em diversos grupos de microrganismos (VPPCB, 2018).

Na microbiologia clínica, houve um avanço significativo na identificação de novas espécies em decorrência da sua relevância para a saúde pública, em comparação com a microbiologia ambiental (MANFIO, 2003). A biodiversidade microbiana ambiental possui limitações nos métodos de isolamento e condições de cultivo e são em grande parte relacionados à falta de conhecimento sobre o ambiente natural desses organismos (WCFF, 2010).

Um dos desafios a vencer é a infraestrutura institucional e os recursos humanos precários que são usados para o depósito de material biológico em repositórios nacionais. Com isso, a capacitação técnica e operacional é um agente decisivo para o desempenho das atividades de apoio à comunidade científica, o que resulta na necessidade de capacitação da equipe de profissionais qualificados, de uma infraestrutura apropriada e de normas adequadas da WCFF para o bom funcionamento de uma coleção através de procedimentos operacionais, conhecidos como POP (procedimento operacional padrão) (CANHOS, 2003). Através da sistematização desses procedimentos, cada membro da equipe, poderá de modo padronizado isolar, manipular e identificar um material biológico que é depositado numa coleção microbiológica. Outro desafio é a expansão do acervo e este deve ser um dos focos principais das coleções, encorajando continuamente o depósito de material biológico, realizando assim intercâmbio entre as instituições e coleções nacionais e internacionais. Os materiais biológicos devem ser devidamente identificados e a coleção deve produzir ferramentas disponíveis com a finalidade de garantir que todas as linhagens ou culturas estejam classificadas taxonomicamente. O registro e a documentação das linhagens depositadas devem ser feitos em conjunto pelo depositante. Tais informações como: nome do organismo, número em outras coleções, histórico, tipo de organismo, restrições, condições de crescimento, dados de referências bibliográficas e assinatura do depositante devem constar nesses documentos (WCFF, 2010).

Com a informatização e a estruturação de catálogos *on-line* sobre o acervo, ocorre a rápida rastreabilidade de informações relacionadas, permitindo incorporar dados variados ao registro das amostras/linhagens, como fotografias,

sequenciamento de DNA, procedimentos-padrão, propriedades específicas. Com isso, a conduta adequada para o depósito de amostras em uma coleção microbiológica, desde o recebimento até a estocagem do material, é documentar e realizar procedimentos seguros em lugares apropriados para estes fins, isto é, em laboratórios capacitados (SETTE L., 2015).

Na manutenção e na preservação do material de origem microbiano, métodos diversos podem ser empregados, dependendo das prioridades e do escopo da coleção. Para isso, serviços de autenticação, identificação e caracterização taxonômica envolvem profissionais especializados e técnicas que envolvem uma abordagem polifásica, incluindo análises de morfologia, fisiologia, características bioquímicas e o estudo dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), que envolve por exemplo o uso de abordagens moleculares (ARANDA, 2014).

Em resumo, a administração de uma coleção de referência é algo bastante trabalhoso e implica na capacitação técnica especializada, no uso de infraestrutura específica. Merece uma atenção especial as práticas de controle de qualidade, a biossegurança e a autenticação dos acervos. Com o desenvolvimento das coleções, testes de controle de qualidade e autenticação passaram a ser procedimentos de rotina, operando um sistema rigoroso de qualidade e de referência, com reconhecidos de sistemas de acreditação e de acordo com os princípios gerais de boas práticas de laboratório (FRAGA H.C., *et al.*, 2012).

Ao longo do processamento de uma amostra, desde o seu registro de entrada na coleção até a sua saída (distribuição), testes são realizados em diferentes etapas para a avaliação de sua identidade, viabilidade e pureza. Fatores essenciais para o crescimento e a manutenção de cada amostra devem ser considerados como a preparação e a esterilização de meios de culturas e reagentes. Para isso, tais meios de cultivos e reagentes devem ser preparados e devidamente documentados usando protocolos padronizados.

A comprovação da identidade de uma cultura é um fator indispensável para uma coleção, visto que um determinado microrganismo pode ser depositado com uma identidade que não é a verdadeira. Um outro fator importante é a viabilidade da amostra diante dos métodos de preservação e caracterização, uma vez que cada organismo pode responder de forma diferente aos diversos métodos aplicados para a sua classificação (WFCC, 2010).

A distribuição do material biológico inadequado, com identificação incorreta pode levar a sérios problemas com consequências irreparáveis para a pesquisa, além de gerar altos custos e a publicação de resultados errôneos. O uso de amostras puras e autenticadas asseguram a realização de boas pesquisas (CANHOS V.P. *et al.*, 2015).

A garantia da qualidade do acervo é de responsabilidade da coleção e por isso, esta deve operar com base em padrões apropriados para que o material biológico possa ser certificado. Isso garante ao consumidor um padrão de qualidade e também a manutenção e autenticidade da amostra (SETTE, 2015).

D) A Coleção de Protozoários da FIOCRUZ – COLPROT

A Coleção de Protozoários da Fiocruz, COLPROT (<http://colprot.fiocruz.br>), conta com um acervo de mais de 700 isolados da classe Kinetoplastea, majoritariamente de protozoários pertencente à família Trypanosomatidae e também outras famílias que passaram a ser incluídas no seu acervo, como a família Hexamitidae (*Giardia* sp.) e a família Trichomonadidae (*Trichomonas* sp.). Esta coleção está filiada à *World Federation of Culture Collection, WFCC*, sob o registro WDCM 1020.

A COLPROT iniciou suas atividades em 1991, com a organização e preservação de diversos representantes de praticamente todos os gêneros da família Trypanosomatidae. Esta coleção contém por exemplo, uma fantástica abundância de representantes de um mesmo gênero, como por exemplo os diversos isolados de *Trypanosoma cruzi* e diversos representantes do gênero *Trypanosoma*, como: *T. evansi*, *T. brucei*, *T. conorhini*, *T. freitasi*, *T. lewisi*, *T. rangeli*, *T. vespertilionis*, etc. Além disso, esta coleção alberga ainda uma ampla variedade dos gêneros de tripanossomatídeos encontrados em insetos e plantas, como aqueles pertencentes aos gêneros *Angomonas*, *Crithidias*, *Herpetomonas*, *Phytomonas*, *Leptomonas* entre outros. Cabe ainda destacar que a COLPROT possui protozoários de vida livre, como *Bodo* sp., que são considerados ancestrais dos tripanossomatídeos e que são usados em estudos sobre a evolução desta família (JACKSON *et al.*, 2008). Em 1995, esta coleção recebeu reconhecimento institucional e foi credenciada sob o nome de Coleção de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (CT-IOC). Com a publicação do manual de organização de

Coleções Biológicas pela Fiocruz (<https://portal.fiocruz.br/documento/manual-de-organizacao-de-colecoes-biologicas-da-fiocruz>), esta Coleção passou por uma reestruturação e em 2010, foi reconhecida institucionalmente, através de portaria presidencial, sob o nome de Coleção de Protozoários da Fiocruz. A partir daí e com o empenho dos pesquisadores, obtivemos a inclusão de outras famílias como por exemplo a Trichomonadidae, Blastocystidae, entre outros, o catálogo foi informatizado e disponibilizado *on-line* e uma série de procedimentos passaram a ser revisados buscando a excelência do acervo (<http://colprot.fiocruz.br>).

O objetivo principal da coleção de protozoários, é a preservação, armazenamento, distribuição e caracterização taxonômica dos microrganismos. Além disso, a coleção visa também a ampliação do seu acervo, seja através da obtenção de novos isolados por atividades de coleta realizadas por membros da equipe da COLPROT, ou através do depósito realizados por pesquisadores atuantes em biodiversidade e taxonomia. Quando a COLPROT recebe a demanda de um novo depósito, o material biológico é registrado no livro tombo que gera um código, que é cadastrado no sistema Sicol, que é automaticamente integrado ao sistema Specieslink, e se o depósito for de livre acesso, o registro passa a ser visualizável no catálogo *on-line*, disponível, em <http://colprot.fiocruz.br>, e no site do Specieslink. Em seguida, é feita a sua manutenção com o preparo de meios de cultura, um dos passos fundamentais no crescimento e manutenção de materiais biológicos. Com o estabelecimento das condições de cultivo, diversas técnicas de criopreservação são testadas, até a identificação das condições que permitam a viabilidade do espécime em nitrogênio líquido, minimizando ao máximo o tempo de cultivo, pois isto pode afetar as características genéticas do microrganismo. Após o sucesso destas etapas, a cultura poderá ser fornecida à comunidade científica, a partir do preenchimento de uma solicitação à COLPROT.

A elaboração dos POPs foi baseada nas normas da gestão da qualidade da FIOCRUZ (VPPCB, 2018 - Manual de Organizações Biológicas da FIOCRUZ), na BNT NBR ISO 9001:2008 - Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos (ABNT, 2015; ABNT, 2017).

E) Classe Kinetoplastea

Os cinetoplastídeos são protozoários que divergem evolutivamente cedo do último eucarioto ancestral (LECA – de *Last Eukaryotic common ancestors*) e que apresentam uma variada capacidade metabólica e de adaptação a condições adversas do meio ambiente (HAMER *et al.*, 2016).

Essa classe é caracterizada por apresentar um arranjo único de DNA mitocondrial conhecido como kDNA ou cinetoplasto, que se caracteriza por um arranjo compacto e concatenado, facilmente visualizável ao microscópio óptico com auxílio de técnicas de coloração simples (NEVES *et al.*, 2011; VICKERMAN, 1976; JENSEN & ENGLUND, 2012).

Os protozoários da classe Kinetoplastea pertencem ao reino Excavata, filo Euglenozoa (CAVALIER-SMITH, 1998; HONINGBERG, 1963), e apresentam tipicamente um ou dois flagelos emergindo de uma bolsa flagelar, podendo ser protozoários de vida livre, ou parasitas que infectam vertebrados, invertebrados e plantas (WALLACE, 1966).

Previamente hierarquizada como ordem Kinetoplastida, a classe Kinetoplastea, era dividida em duas subordens: Trypanosomatina e Bodonida, que apresentam caracteres morfológicos e ciclo de vida bem definidos (SIMPSON *et al.*, 2006; STEVENS, 2008). Nos dias atuais, a hierarquização taxonômica da classe Kinetoplastea foi reavaliada através de estudos filogenéticos, que consideram a descrição de novas espécies e gêneros e pelo sequenciamento de mais marcadores e de um maior número de isolados. A atual proposta é de que a classe Kinetoplastea seja dividida em duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina. A subclasse Prokinetoplastina apresenta apenas a ordem Prokinetoplastida, que por sua vez, apresenta dois gêneros: *Ichthyobodo* e *Perkinsela*. A subclasse Metakinetoplastina apresenta quatro ordens, das quais três são de bodonídeos (Neobodonida, Eubodonida e Parabodonida), e a ordem Trypanosomatida, representada por uma única família (Trypanosomatidae) que é constituída por parasitas obrigatórios (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2015; DESCHAMPS *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2004; STEVENS, 2008) (Figura 1).

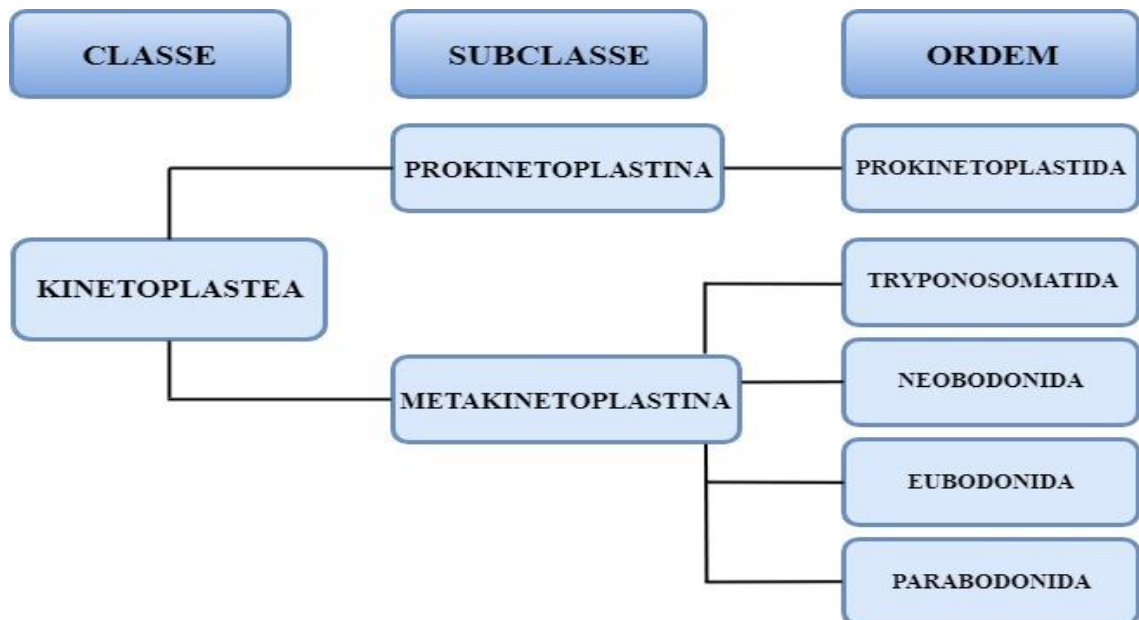


Figura 1: Representação esquemática da classificação taxonômica da Classe Kinetoplastea. Fonte: modificado de d'AVILA-LEVY *et al.*, 2016.

A ordem Trypanosomatida é composta por vários gêneros. Alguns gêneros, como exemplo *Crithidia* spp., *Herpetomonas* spp., *Leptomonas* spp., entre outros, são parasitos que possuem um ciclo de vida em um só hospedeiro, geralmente um inseto. Esse tipo de ciclo é denominado monoxênico (REY, 2008). Já no ciclo heteroxênico, o parasito completa o seu desenvolvimento passando por várias vezes e sempre na mesma ordem por dois ou mais hospedeiros, usualmente um inseto vetor, e um hospedeiro vertebrado, onde usualmente causa uma patologia (REY, 2008) (Figura 2). Por exemplo, os parasitas *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei sensu lato* e *Leishmania* spp, são os agentes etiológicos da Doença de Chagas, doença do sono e as leishmanioses, que coletivamente afetam mais de 22 milhões de pessoas em todos os continentes (RODRIGUES *et al.*, 2014).



Figura 2: Ilustração da ordem Trypanosomatida com alguns gêneros e seus respectivos hospedeiros. Cada gênero apresenta diferentes formas evolutivas. Fonte: (OLSEN, 1986).

A morfologia destes parasitos varia enormemente ao longo do ciclo de vida e em cultivo no laboratório. A posição do cinetoplasto em relação ao núcleo é um dos critérios usados para definir as diferentes formas de desenvolvimento destes protozoários, que contém um único flagelo que emerge a partir bolsa flagelar. Devido à sua importância para a saúde humana e animal, os tripanossomatídeos têm sido estudados de forma mais intensa do que os bodonídeos, que são protozoários de vida livre (revisado por LUKES *et al.*, 2014; STEVENS & GIBSON, 1999). Um outro aspecto bastante interessante, e com pouquíssimos relatos, é o fato de algumas espécies de tripanossomatídeos monoxênicos, já terem sido encontradas em hospedeiros vertebrados de sangue quente, demonstrando assim, a sua capacidade de adaptar-se às novas condições ambientais, bastante diferentes daquelas experimentadas em insetos. Os mecanismos moleculares de tais adaptações são

atualmente desconhecidos, e destacamos dois relatos recentes, como o isolamento de *Leptomonas* sp., em paciente com kalazar na Índia (SRISVASTAVA *et al.*, 2010) e a resistência térmica de *Crithidia thermophila* (ISHEMGULOVA *et al.*, 2017).

Todos os bodonídeos remanescentes pertencem à subclasse Metakinetoplastina e estão abrigados em uma destas três ordens: Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2015). Os bodonídeos não infectam seres invertebrados, vertebrados ou mesmo plantas, pois possuem vida livre (VICKERMAN, 1978). Estes parasitos são organismos eucarióticos heterotróficos unicelulares com ampla distribuição em habitats de água doce, marinhos e solo podendo alternar estágios nas formas trofozoítica e cística em seu ciclo biológico (HAUSMANN *et al.*, 2003; VICKERMAN, 1994).

Por sua vez, a ordem Prokinetoplastida apresenta gêneros como o *Ichthyobodo* e o *Cryptobia*, que contém parasitas de peixes, e também o *Perkinsela*, que contém protozoários que vivem em associação mutualística com protistas amebóides do gênero *Neoparamoeba*. Entre os cinetoplastídeos, há desde aqueles de vida livre (bodonídeos), como os que desenvolvem associações simbióticas benéficas ou os que são parasitas. Neste último caso, há fortes indícios de que o estilo de vida parasitária ocorreu no curso da evolução mais de uma vez e de modo independente entre os cinetoplastídeos (LUKES *et al.*, 2014).

Algumas espécies de bodonídeos são globalmente distribuídas, o que suporta o paradigma de que “eles estão em toda parte” formulado para os protistas de vida livre. Entretanto, apesar das análises morfológicas aparentemente apoiarem essa hipótese, ainda não existem dados moleculares suficientes para confirmá-la adequadamente (ATTIAS *et al.*, 1996). Os bodonídeos apresentam dois flagelos heterodinâmicos, localizados dentro de uma bolsa flagelar especializada, os processos glicolíticos estão confinados a uma organela denominada glicossomo. Um dos flagelos, o anterior, é projetado para a frente onde são encontradas estruturas relacionadas com a endocitose e possui as mastigonemas. Já o flagelo posterior denominado de flagelo de arrasto, encontra-se livre e normalmente é usado na captura de nutrientes e mesmo bactérias inteiras, que servem como alimento (VICKERMAN, 1978). Entre as estruturas internas do *Bodo* sp. estão o vacúolo contrátil, a citofaringe, o citóstoma, o cinetoplasto, o complexo de Golgi, o vacúolo alimentar, o núcleo e a mitocôndria. (Figura 3).

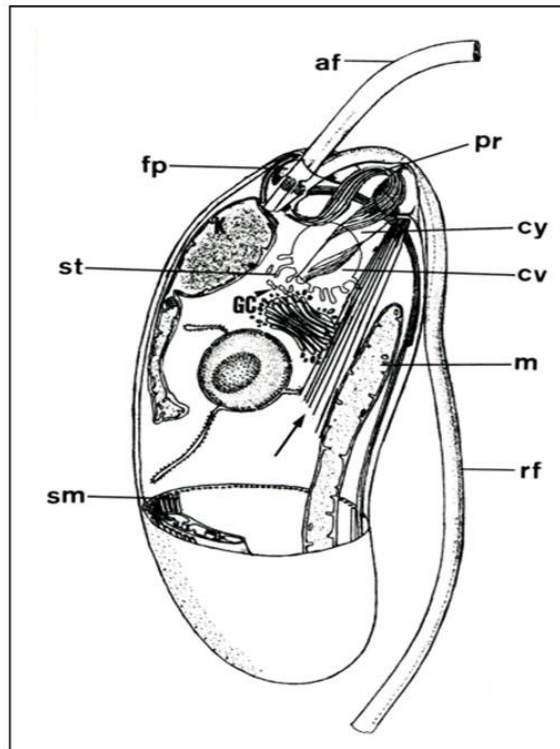


Figura 3: Componentes intracelulares do *Bodo* sp. Flagelo anterior (af), o flagelo recorrente (rf), cinetoplasto (k), microtúbulos subpeliculares (sm), crista pré-oral (pr) e os citotubulos (cy), mitocôndria (m), o vacúolo contrátil (cv), complexo de Golgi (gc), túbulos esponginosos (st). Fonte: (ATTIAS *et al.*, 1996).

Na ultraestrutura celular dos bodonídeos podemos destacar também o citóstomo, localizado na região anterior do protozoário, próximo a bolsa flagelar. É para esta região, que as bactérias capturadas e as grandes moléculas são direcionadas e posteriormente internalizadas (VICKERMAN, 1991). Assim como nos tripanossomatídeos, a mitocôndria é única e ramificada, porém neste caso, o cinetoplasto é formado por DNA circular não concatenado, de modo que o kDNA não forma uma rede, mas é sim composto de minicírculos e maxicírculos livres (LUKES *et al.*, 2014; VICKERMAN, 1977). O cinetoplasto, serve como critério taxonômico e na descrição da diferenciação das formas evolutivas das espécies (LUKES *et al.*, 2014). O DNA nele contido (kDNA) pode se apresentar de diferentes formas: 1) Pan-kDNA é uma estrutura que preenche a maior parte da área da matriz mitocondrial; 2) Poly-kDNA é uma estrutura de kDNA que é distribuído entre vários focos discretos

na matriz mitocondrial; 3) Pro-kDNA é uma estrutura de um único feixe na região matriz mitocondrial que se assemelha superficialmente a um disco de kDNA. Esse feixe pro-kDNA está situado perto do corpo basal do flagelo; 4) O Mega-kDNA, mais incomum, o kDNA é distribuído uniformemente em toda grande área da matriz mitocondrial. Todavia, o cinetoplasto da forma flagelar dos bodonídeos na maioria das vezes apresenta a forma de pro-kDNA (LUKES *et al.*, 2014). Por sua vez, a forma cística, tanto o cinetoplasto quanto a mitocôndria são fragmentados em nódulos, nesta forma, os flagelos desaparecem parcialmente e uma parede lisa circunda o protozoário (VICKERMAN, 1991).

Na figura 4, observamos as principais estruturas internas do *Bodo* sp. através da microscopia eletrônica de transmissão. O núcleo, a mitocôndria, o vacúolo contrátil, o esponjólito contrátil do vacúolo e, uma parte da bactéria já ingerida. Os flagelos anteriores recorrentes podem ser observados na seção longitudinal, sendo que um dos flagelos, uma pequena parte recorrente é fixada à membrana plasmática. Observamos também a entrada do citóstomo e a crista pré-oral.

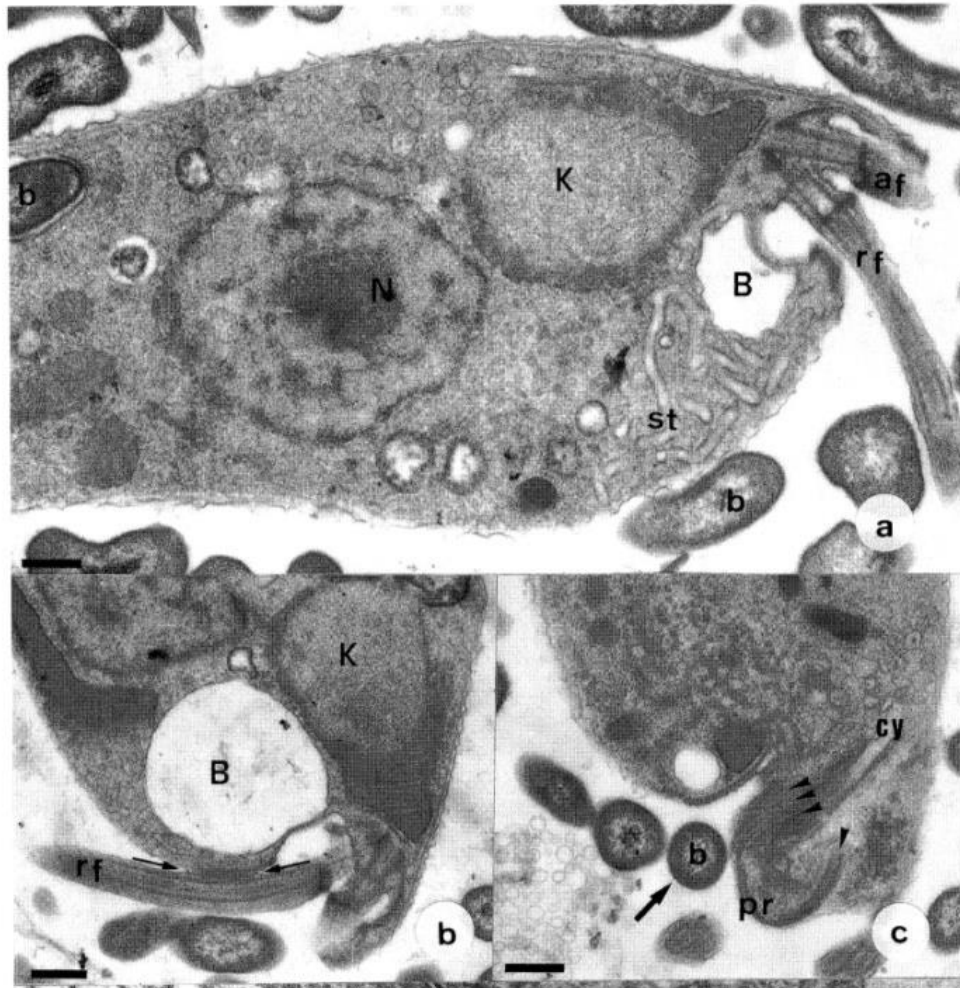


Figura 4 a-c: Microscopia Eletrônica de Transmissão de *Bodo* sp. Em (a) é possível observar o núcleo (N), o cinetoplasto contendo kDNA (K), o vacúolo contrátil (B), o flagelo recorrente (rf), o flagelo anterior (af), o espongioma (st), e bactérias (b) no meio extracelular. Na Fig. b as setas indicam uma parte do flagelo recorrente ligada à membrana plasmática e na fig. c, a seta indica a entrada da bactéria (b) no citóstomo (cy), é possível também observar a borda pré-oral (pr). Fonte: (ATTIAS *et al.*, 1996).

F) Primatas não-humanos (PNH)

No presente estudo, a avaliação de fezes e de sangues de PNHs teve como intento estudar a diversidade parasitária de cinetoplastídeos, além de servir como um protótipo para a elaboração dos protocolos operacionais padrão (POPs), do fluxograma de trabalho para obtenção, triagem e caracterização de novos isolados, que coletivamente servirão como instrumento para garantir a qualidade na COLPROT.

Os primatas não humanos pertencem ao reino Metazoa, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Primata. A ordem Primata se distribui nas florestas tropicais e

subtropicais do planeta Terra (MITTERMEIER *et al.*, 1994) e inclui desde as espécies mais primitivas como por exemplo, os prossímios até a espécie mais evoluída, o *Homo sapiens*. A sua taxonomia é amplamente rica em gêneros, espécies e subespécies, havendo também uma grande diversidade morfológica.

Considerando a taxonomia, a ordem Primata é subdividida em duas subordens: Strepsirrhini e Haplorrhini. Na ordem Strepsirrhini, encontramos os primatas conhecidos como prossímios. Temos como exemplo a espécie *Lemur catta* que é também conhecido como lémure-de-cauda-anelada. A subordem Haplorrhini, é formada por duas superfamílias: Tarsiioidea e a Anthropeidea. Em Tarsiioidea encontramos os tásios. A superfamília Anthropeidea contém todos os macacos, símios e os homínídeos.

A superfamília Anthropeidea é dividida em duas infra-ordens; a Catarrhini e a Platyrrhini. Na Catarrhini encontramos as espécies de primatas do Velho Mundo (continentes asiático e africano) sendo que esta possui quatro famílias: Cercopithecidae, Hylobatidae, Pongidae e Hominidae (NOWAK, 1999). Tais famílias apresentam seus respectivos gêneros: *Macaca*, *Hylobates*, além do gênero *Pan* e *Homo sapiens*. Entretanto, Groves, em 2001, classifica Pongidae juntamente com os Hominidae pela sua similaridade genética com o *Homo sapiens*.

A infra-ordem Platyrrhini (espécies de primatas do Novo Mundo que estão localizados no continente Americano) possuem diferentes gêneros: *Aotus*, *Callithrix*, *Cebus*, *Saguinus* e *Saimiri*. Nesse grupo existe uma grande diversidade de primatas. Com isso, há extensivas revisões feitas para as famílias dos Calitriquídeos e Cebídeos (RYLANDS, 1993; RYLANDS *et al.*, 1993; RYLANDS & RODRIGUES-LUNA, 2000). Podemos observar o *status* taxonômico de PNH sintetizado na figura 5.

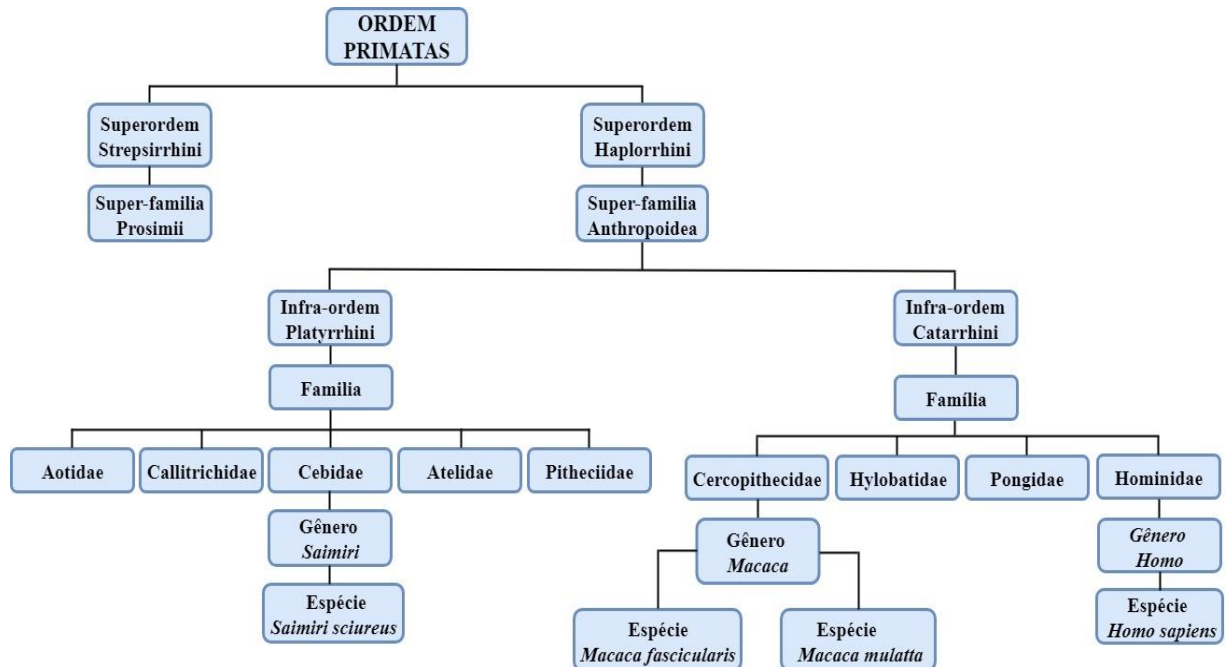


Figura 5: Classificação taxonômica dos primatas não humanos. Fonte: modificado de (GROVES, 2001).

Segundo (WILSON & REEDER, 1993), a fauna dos primatas, possui mais de 270 espécies e várias subespécies nas regiões tropical e neotropical. As primeiras colônias de primatas foram estabelecidas em 1920, tanto no Brasil quanto em todo o mundo, por apresentarem uma grandiosa população e por possuírem condições de adaptação ao cativeiro. Nas pesquisas, o modelo primata foi pouco usado, por Louis Pasteur (PASTEUR *et al.*, 1884). Com o decorrer dos anos, os centros de primatologia foram sendo utilizados para a pesquisa em diversas áreas da biomedicina, por apresentarem uma proximidade evolutiva e características genéticas semelhantes às do ser humano.

No mundo, foram sendo desenvolvidos vários centros de primatologia junto com as instituições que utilizavam os primatas para as pesquisas experimentais (FRIDMAN, 1972). No Brasil, existe na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), desde o início do século XX, um centro de criação de primatas, que teve como objetivo o estudo das doenças tropicais. O departamento de Primatologia do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), hoje conhecido como Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) iniciou o estabelecimento da colônia de *Macaca mulatta*, em 1932, com o pesquisador Carlos Chagas para promover estudos de uma vacina contra a febre amarela. Os animais foram mantidos semi-livres em uma ilha por cerca de 50 anos, onde foi instituído um programa de manejo de colônias

em termos de nutrição e reprodução, com condições mínimas de saneamento (COIMBRA-FILHO & MAIA, 1974) e a criação se manteve em um sistema de grupos familiares. Em 1980, os animais foram transferidos para o campus de Manguinhos, da Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ.

A colônia da *Macaca fascicularis* foi iniciada em 1986, para a realização de testes de neurovirulência da vacina da febre amarela, que era produzida em culturas de fibroblastos. Tal espécie de primata é proveniente das Filipinas, enquanto a *Macaca mulatta* é oriunda da Índia (Figura 6). Podemos observar, na figura abaixo, a predominância da espécie *Macaca mulatta* na China e na Índia, tendo a interseção com a *Macaca fascicularis* nos países Camboja e Vietnã. A espécie *Macaca fascicularis* predomina na Indonésia e nas Filipinas.

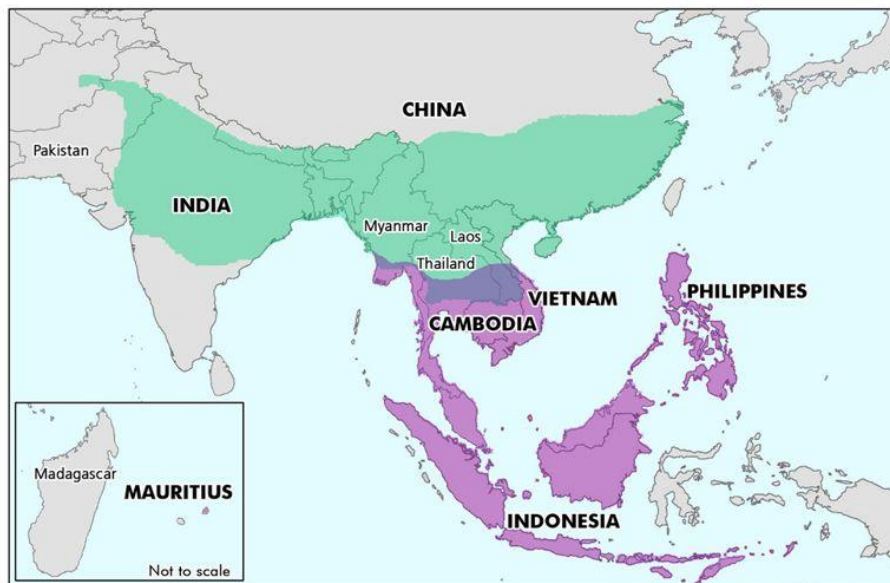


Figura 6: Distribuição geográfica dos primatas no Velho Mundo

■ Distribuição aproximada da espécie *Macaca mulatta*.

■ Distribuição aproximada da espécie *Macaca fascicularis*.

■ Distribuição das duas espécies.

Fonte: (STREET *et al.*, 2007)

Em 1987, teve início uma nova colônia, a dos primatas *Saimiri* sp. e *Samiri sciureus*, que são animais silvestres recuperados da região amazônica, com a intenção de desenvolver uma vacina contra a malária. Desde então, nenhum animal novo foi introduzido nessas colônias desde o seu estabelecimento (Figura 7).

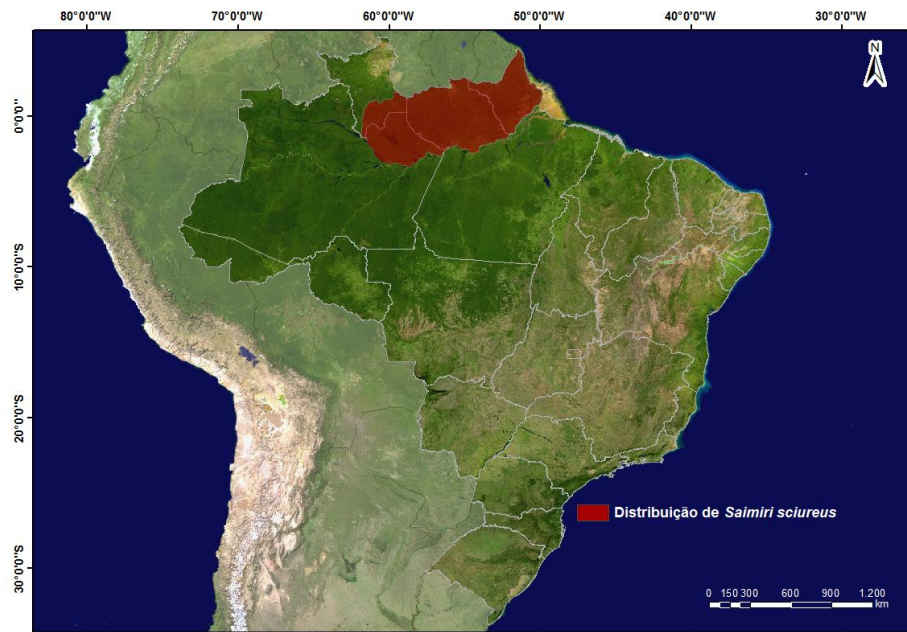


Figura 7: Localização geográfica do *Saimiri sciureus* no Brasil.

Fonte: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira>

As espécies *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, são consideradas taxonomicamente como primatas do Velho Mundo. Por sua vez, *Saimiri sciureus*, é considerada um primata do Novo Mundo. Na morfologia dos primatas do Velho Mundo, distinguem-se a posição das aberturas nasais, que é voltada para baixo, e a presença de um septo nasal delgado. Estes animais possuem 32 dentes; unhas achatadas (nunca em garras); e algumas espécies apresentam calosidades ciáticas, de colorido vivo; a cauda, quando presente, não é preênsil (ANDRADE, 2002).

A espécie *Macaca mulatta*, conhecido vulgarmente como macaco Rhesus. A sua coloração varia de marrom clara a bege amarelada com a face nua, róseo-avermelhada. A dieta de macacos rhesus é basicamente vegetariana, constituída por folhas, frutos, tubérculos e ocasionalmente pequenos invertebrados. Além de alimentar-se de sementes, resina, goma de plantas, gramíneas, casca de árvores e bulbos. Os macacos rhesus são alojados em grupos coletivos, em sistema de harém, um macho reprodutor para até 10 fêmeas em idade reprodutiva (Figura 8).



Figura 8: Foto de um primata não-humano da espécie *Macaca mulatta*.
Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Macaca_mulatta

A espécie *Macaca fascicularis* conhecido como macaco Cynomolgus, que tem a coloração marrom claro à marrom acinzentado, possuem uma cauda bastante longa (Figura 9). Seus hábitos são diurnos e sua dieta é constituída basicamente de frutas e outras partes vegetais, mas pequenos vertebrados também podem ser consumidos. Vivem em grupos sociais em sistema de poligamia.



Figura 9: Foto de um primata não-humano da espécie *Macaca fascicularis*.
Fonte: <https://primata.ipb.ac.id/macaca-fascicularis/>

Os primatas do Novo Mundo, se distinguem das espécies do Velho Mundo por terem o septo nasal largo, o polegar não completamente oponível, a ausência de calos ciáticos e de bolsas jugais, e a dentição, constituída por 32 ou 36 dentes, com 6 pré-molares superiores e 6 inferiores. No conjunto, são de porte menor. Um grupo de espécies possui a cauda preênsil. Exclusivamente arborícolas, não existem espécies adaptadas à vida terrícola. Em geral, habitam terrenos florestados e poucos descem ao solo em busca de água ou alimento, que encontram com abundância no alto das árvores (ANDRADE, 2002). A sua origem e a história de sua migração para a América do Sul são ainda discutidas em virtude da escassez de fósseis.

A espécie *Saimiri sciureus*, também é chamado de boca preta ou macaco de cheiro. A sua dieta alimentar é composta por frutas, insetos, moluscos e pequenos vertebrados. *S. sciureus* possuem arcos orbitais arredondados, do tipo romano, orelhas pontiagudas e com presença de pelos. Todas as espécies deste gênero, possuem hábitos diurnos e são exclusivamente arborícolas, alimentando-se de frutas, cereais, vegetais e alguns insetos. A sua pelagem é curta e espessa, de coloração que varia conforme a espécie, porém no geral têm as partes superiores cinza-oliva-amareladas e as inferiores branco-amareladas. São animais poligâmicos e vivem em grupos sociais (Figura 10) (DEMARAY *et al.*, 1978; KAPLAN, 1977).



Figura 10: Foto de um primata não-humano da espécie *Saimiri sciureus*.
Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Saimiri_sciureus

Análises individuais ou coletivas destas interações dos primatas podem ser utilizadas como modelos para estudos biológicos, de biodiversidade, epidemiológicos, e podem auxiliar no entendimento do processo dinâmico saúde-doença. Os primatas não humanos, devido à proximidade filogenética com a espécie humana, apresentam uma susceptibilidade a vários agentes etiológicos e, vários parasitos são compartilhados entre estes seres (SOUZA-JUNIOR, 2007). Segundo Pissinatti (PISSINATTI, 2001) resultados de análises de necropsia em primatas do novo mundo mostram que as doenças parasitárias são as mais prevalentes, tais como, o *Toxoplasma gondii* e *Giardia* sp.

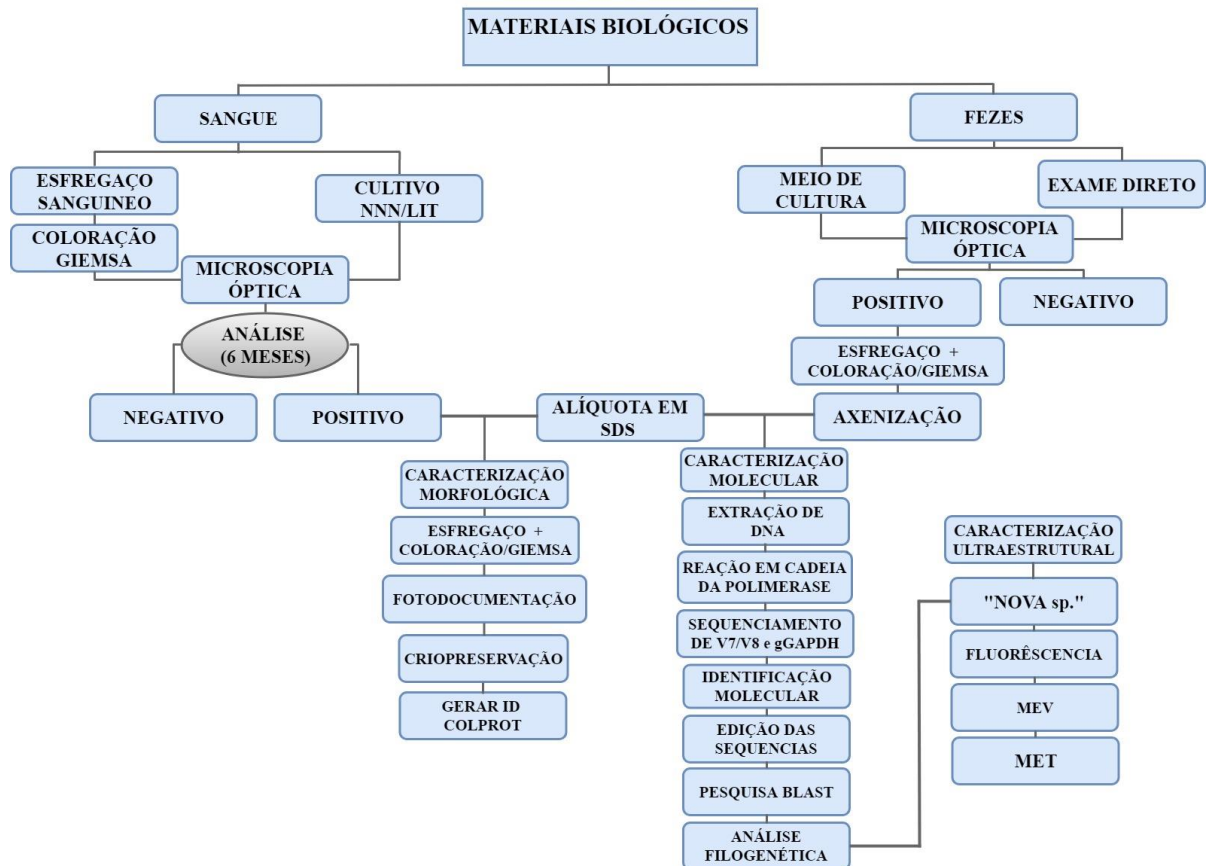
As condições ambientais como temperatura, umidade, iluminação, devem ser cuidadosamente adequados para cada espécie de primatas não humano. Além das normas de biossegurança que devem ser rigorosas como por exemplo as vacinas dos cuidadores desses animais devem estar em dia, evitando assim o comprometimento da saúde dos primatas (ANDRADE, 2002).

As ações antropogênicas alteram drasticamente a relação parasito, vetor e hospedeiro, através de adaptações evolutivas. Essas alterações estabelecem novas relações entre hospedeiros e parasitos, assim como novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão de doenças e no processo evolutivo dos organismos (HOLSBACK *et al.*, 2013). Esta dinâmica de eventos propicia a veiculação de microrganismos de forma multidirecional, entre os animais de vida silvestre, entre os animais de vida urbana e, possivelmente da vida urbana para silvestre e vice-versa. Os primatas não humanos, são considerados animais nobres, por serem transmissores de doenças patogênicas e que são altamente susceptíveis a infecções comum ao homem. Por esse motivo, os macacos são modelos satisfatórios para experimentações científicas, simulando a patogenia de diversas doenças que afetam o homem.

Poucos são os estudos sobre identificação e caracterização molecular de protozoários encontrados em primatas não humanos (PNHs). Os protistas representam um universo pouco conhecido e explorado quanto à sua biologia, biodiversidade, ecologia, identificação taxonômica. Os cinetoplastídeos são ainda pouco estudados em PNH, exceto alguns tripanossomatídeos sanguíneos e teciduais, como *Trypanosoma minasense*, *T. saimirii*, *T. rangeli* (ZICCARDI & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1998), sendo que a flora intestinal enquanto nicho ecológico ainda não foi devidamente explorada.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Validação do fluxograma do processo de obtenção de isolados feito na coleção de protozoários/FIOCRUZ



4.2 Amostragem

Neste estudo, foram coletadas e analisadas 60 amostras de fezes e de sangue de primatas não humanos (PNHs): 19 amostras foram obtidas de *Macaca fascicularis*, 30 de *Macaca mulatta* e 11 amostras de *Saimiri sciureus*, sendo estes primatas oriundos do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz), antigo Centro de Criação de Animais de Laboratório (Cecal). Todas as amostras foram exclusivamente coletadas pelos médicos-veterinários dos respectivos cativeiros durante o exame clínico realizado periodicamente nestes serviços.

A coleta de sangue foi realizada diretamente da veia femoral, usando seringa hipodérmica de 5 mL e agulha compatível com o porte do animal e calibre dos vasos. Antes da punção venosa foi realizada a assepsia no local da coleta e ao término do procedimento foi aguardada a completa hemostasia antes de libertar o animal. O volume de sangue coletado foi de 1,5 mL, sendo este depositado em

frasco contendo como anticoagulante o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em volume compatível com o peso do animal.

Cada amostra fecal foi coletada individualmente em um frasco limpo, hermeticamente fechado com tampa de rosca e identificado com os dados do animal (número, procedência, sexo, espécie).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa animal (CEUA/FIOCRUZ nº 46934-1).

4.3 Meio de cultura:

Os meios de cultura utilizados neste estudo foram:

4.3.1 *Liver Infusion Tryptose (LIT)*

Composição 5,0 g/L, Tryptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCl 0,4 g/L, Na₂HPO₄·H₂O 4,26 g/L, Glicose D + anidra 2,0 g/L e Hemina 0,01 g/L junto ao meio de cultivo. Seu pH é de 7.2. O soro fetal bovino será colocado posteriormente a esterilização. O meio de cultura será suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 56 °C por 30 min (CAMARGO, 1964). Imediatamente após o preparo, o meio foi esterilizado por vapor úmido a 120 °C por 20 min.

4.3.2 *Nicolle-Novy-Neal/Liver Infusion Tryptose; (NNN/LIT)*

Composição: 3,0 g de Agar (BactoAgar) e 1,5 g de NaCl. Imediatamente após o preparo, o meio é esterilizado por vapor úmido a 120 °C por 20 min, após o resfriamento até aproximadamente 50 °C, o meio é suplementado com 10% de sangue de carneiro desfibrinado estéril, e cerca de 4 mL de meio fundido são distribuídos em tubos de vidro com tampa de rosca (18 x 180 mm) que são mantidos a 15 graus de inclinação até a solidificação do ágar. Em seguida, é adicionado o meio de fase líquida, LIT, descrito no item 4.3.1 (TAYLOR & BAKER, 1986).

4.3.3 *Schneider*

Composição: sais inorgânicos (CaCl₂ 600,00 mg/L; KCl 1.600,00 mg/L; MgSO₄ 1.807,00 mg/L; NaCl 2.100,00 mg/L; NaHCO₃ 400,00 mg/L; Na₂HPO₄ 700,00 mg/L; KH₂.PO₄ 450,00 mg/L), aminoácidos (Beta-alanina 500,00 mg/L; L-arginina 600,00 mg/L; L-cisteína 60,00 mg/L; ácido L -aspártico 400,00 mg/L; L-cistina. 2HCl 30,00 mg/L; ácido L -glutâmico 800,00 mg/L; L-glutamina 1.800,00 mg/L; glicina 250,00 mg/L; L-histidina 400,00 mg/L; L-isoleucina 150,00 mg/L; L-leucina 150,00 mg/L; L-

lisina 1.650,00 mg/L; L-metionina 150,00 mg/L; L -prolina 1.700,00 mg/L; L-serina 250,00 mg/L; L-treonina 350,00 mg/L; L-triptofano 100,00 mg/L; L-tirosina 2Na.2H₂O 500,00 mg/L; L-valina 300,00 mg/L), vitaminas (Ácido Fumárico 60,00 mg/L; Alfa-Ácido Ketoglutárico 350,00 mg/L; (-) Ácido L -Malico 600,00 mg/L; Ácido Succinico 60,00 mg/L), carboidratos (D[+] Trehalose 2.000,00 mg/L), glicose (2.000,00 mg/L) e extrato de levedura (2.000,00 mg/L). Este meio é comprado pronto em solução estéril e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 56 °C por 30 min (EVANS *et al.*, 1964).

4.4 Triagem de cinetoplastídeos nas amostras

4.4.1. Cultivo a partir de sangue de PNHs

Todo o sangue coletado foi inoculado em meio de cultura bifásico NNN/LIT. As culturas foram mantidas em estufa de BOD a 28 °C e observadas na microscopia de luz a cada 3 dias, e as culturas foram acompanhadas por um período de 6 meses. Os esfregaços de culturas positivas foram fixados com metanol e corados com Giemsa tamponado (GALVÃO *et al.*, 1989).

4.4.2. Preparo e cultivo da amostra fecal

Aproximadamente 5 g de material fecal foram homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato salina (PBS: NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4), previamente esterilizado por vapor úmido a 120 °C por 20 min. A quantidade do material fecal variou de acordo com o tamanho do animal. Em seguida, uma gota do homogeneizado (50 µL) foi analisada ao microscópio de luz.

Para o isolamento dos protozoários foram adicionados 50 µL deste homogenato em meio de cultura LIT, suplementado com antibiótico piperacilcina (2,2 mg/50 µL). As culturas foram mantidas em estufa BOD à 28 °C. A cada 3 dias, as culturas foram examinadas no microscópio óptico para observar a presença de cinetoplastídeos, as culturas positivas para flagelados foram sub-cultivadas até a obtenção dos isolados.

4.5 Processo de axenização, clonagem e criopreservação das culturas positivas

Para o processo de axenização dos parasitos observados nas culturas mistas, foram adicionados ao meio LIT diferentes concentrações de antibióticos como: penicilina G (100 U/mL), garamicina (56 µg/mL), piperacilina (22 mg/50 µL) e estreptomicina (0,1 mg/mL) e de antifúngicos, fluconazol (4 µg/mL) e itraconazol (36 µg/mL). Além da utilização de tubo em W para o processo de descontaminação fúngica.

Para a obtenção de clones dos protozoários isolados foram realizadas diluições seriadas (100 µL da cultura + 900 µL de meio LIT), sendo a diluição final de 1:100.000. Periodicamente, a cada dois dias os tubos foram observados em microscopia de luz para evidenciar o crescimento da menor diluição.

Para criopreservação, foram testados diferentes protocolos. As células ressuspendidas em LIT + SFB a 10% foram diluídas nos diferentes crioprotetores, dimetilsulfóxido (DMSO) ou glicerol, nas concentrações de 5%, 10%, 15% ou 20%. Já o metanol ultra puro foi testado entre 3%, 5% ou 10%.

No processo de congelamento, foram empregados dois protocolos: no primeiro foi utilizado um aparato comercial de criopreservação (Nalgene™ cryo 1 °C - “Mr Frosty”, Sigma, USA) contendo álcool isopropílico absoluto. Este recipiente contendo os criotubos foi acondicionado por 12 h a -20 °C, o que permitiu um congelamento a uma taxa de esfriamento de -1 °C/min. Após o congelamento total, os criotubos foram imersos e armazenados em nitrogênio líquido (-196 °C).

No segundo protocolo com congelamento gradual, os criotubos foram colocados inicialmente por imersão em gelo picado por 30 min, seguido por uma etapa de congelamento a -20 °C por 1 h (freezer convencional). Posteriormente, foram colocados numa caixa de isopor contendo gelo seco e acondicionados a -20 °C por 5 min, seguido da etapa de acondicionamento em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após 7 dias, a viabilidade das células criopreservadas foi avaliada através do cultivo do material. Um criotubo do nitrogênio líquido, de um lote de 10, foi descongelado em gelo picado, para posterior adição ao meio de cultivo NNN/LIT. As culturas originais foram mantidas até a checagem da viabilidade das células criopreservadas, os três protocolos de congelamento foram testados até a obtenção de células criopreservadas viáveis.

4.6 Caracterização morfológica dos isolados

4.6.1 Microscopia óptica

Para a observação morfológica ao microscópio óptico, foram confeccionados esfregaços em lâminas. Os isolados foram corados por variações do protocolo Giemsa e pelo método comercial Panótico®.

A técnica de coloração utilizando o corante Giemsa foi baseada em protocolo previamente descrito (CARVALHO, 1973), com algumas modificações, o que gerou três protocolos de coloração, como descrito abaixo. Inicialmente, o esfregaço foi fixado com metanol absoluto por 10 min. Após a etapa de secagem, as lâminas foram cobertas com HCl 5 N por 5 a 10 min e lavadas exaustivamente em água corrente. Em seguida, os esfregaços foram cobertos com uma solução de 1:10, sendo uma parte de corante Giemsa (Merck) e 10 partes de tampão fosfato (NaH_2PO_4 0,2 M e Na_2HPO_4 0,2 M, pH 7,2) por 20 ou 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas rapidamente em água corrente e deixadas à temperatura ambiente para secagem.

O segundo protocolo foi baseado no anterior, porém foi excluída a etapa que utiliza o HCl 5 N. Por sua vez, no terceiro protocolo, o corante Giemsa foi diluído na proporção de 1:50 em água destilada com tempo de coloração variando entre 20 e 25 min.

No método de coloração comercial Panótico®, foi utilizado a solução 1 [triarilmetano (0,1%)] para etapa de fixação do parasito na lâmina por 5 s.

O excesso do fixador foi retirado e em seguida a lâmina foi submergida na solução 2 [xantenos (0,1%)] por 5 s. Na última etapa, os esfregaços foram submergidos na solução 3 [tiazinas (0,1%)] por 3 s. Ao final, foram lavadas com água destilada e deixadas para secar para posterior observação (GURR, 1965).

Todos os esfregaços corados foram examinados em campo claro em microscópio óptico Axio Home (Carl Zeiss, Alemanha) com a objetiva 63 x (Plan-Achroplan 63x/AN = 1,4 oil) e as imagens digitalmente registradas através de câmera Axio Cam HRc. (Dispositivo de Carga Acoplada) (THORN, 2016).

4.6.2. Microscopia de Fluorescência

Para o ensaio de microscopia de fluorescência foi utilizado dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI), que é intercalante de bases nitrogenadas Adenina e Timina tem afinidade por DNA. Os isolados foram lavados duas vezes com PBS por centrifugação a 850 x g por 10 min e em seguida foram fixados em paraformaldeído a 4%. Os parasitos fixados foram adicionados a uma lamínula 13mm² revestida por poli-L-lisina (1 mg/mL). Após 10 min, a lamínula foi lavada em PBS (pH 7,2) e seca à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com 12 µL de DAPI por 5 min à temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas e adicionou-se uma gota de Prolong® durante a montagem das lâminas (LOYOLA-MACHADO *et al.*, 2017). As amostras foram protegidas da luz e armazenadas a -20 °C até o momento da observação em microscópio invertido de fluorescência (Leica DMI6000B).

4.6.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os protozoários foram lavados duas vezes com PBS (pH 7,2) por centrifugação (850 x g por 10 min). A fixação foi realizada por 30 min em 2,5% glutaraldeído tipo I diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas com 1 % de tetróxido de ósmio diluído em tampão fosfato 0,1 M por 45 min. O material foi desidratado através de uma série crescente de etanol (50%, 70%, 90% e duas vezes com etanol absoluto) por 10 min em cada etapa. Após a etapa de desidratação, o ponto crítico foi realizado em aparelho próprio (Bal-tec CPD 030), e o material foi metalizado com ouro (15nm de espessura) (FL-9496 Balzers) antes de ser visualizado em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 250, FEI Company 5 kV e 10 WD) (CATTAPRETA *et al.*, 2016).

4.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a caracterização ultraestrutural dos isolados, as células (aproximadamente 10⁸ células/mL em um total de 5 mL) foram lavadas duas vezes com PBS (pH7,2) por centrifugação (850 x g por 10 min) e em seguida foram fixadas em glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 1 h, em

temperatura ambiente. Em seguida, as células foram pós-fixadas com 2% de tetróxido de ósmio e 2,5% de ferrocianeto de potássio por 45 min em temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas no tampão cacodilato 0,1 M e desidratadas em graus crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e 2 vezes com acetona absoluta) por 10 min em cada concentração. Posteriormente, as amostras foram transferidas para solução contendo iguais volumes de acetona absoluta e resina Epoxy, por 16 h em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram infiltradas em resina Epoxy durante 6 h. Em seguida, o material foi emblocado na mesma resina e a polimerização ocorreu por 72 h, a 68 °C. Os cortes ultrafinos com espessura de 70 nm foram obtidos no ultramicrotomo Reichert (Leica®) e coletados em grades de cobre de 400 mesh. Em seguida, as grades contendo os cortes ultrafinos foram submetidas a contrastação através de incubação com 5% de acetato de uranila por 45 min em temperatura ambiente protegidas da luz. Após este período, as grades foram lavadas com água bidestilada e incubadas em citrato de chumbo por 5 min. Após a contrastação e secagem os cortes foram observados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900 80kV (MOTTA *et al.*, 1997).

4.7 Identificação molecular dos isolados

4.7.1 Extração do DNA

As culturas foram lavadas duas vezes em PBS (850 x g por 10 min), e o pellet foi congelado a -20 °C para posterior extração de DNA, que foi realizada com o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification/Isolation of Genomic DNA (Promega), segundo as instruções do fabricante.

4.7.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amplificações por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), foram realizadas utilizando dois pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados rotineiramente no barcoding de tripanossomatídeos (VOTYPKA *et al.*, 2015). Estes iniciadores flanqueiam parte das regiões do gene que codifica a enzima glicossomal Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH) e da porção V7V8 da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU-rRNA). Além destes, outros iniciadores que amplificam todo SSU-rRNA e são considerados universais para eucariotos ou

cinetoplastídeos foram testados, além de iniciadores que amplificam o alvo citocromo oxidase (COX1) e a região maior do rRNA (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizadas neste estudo

Oligonucleotídeos iniciadores para Kinetoplastídeos	Alvos/Nome do iniciador/Referências
Direto: 5'-GGBCGCATGGTSTTCCAG-3' Reverso: 5'-CCCCACTCGTTRTCRTACC-3'	gGAPDH gGAPDHF/gGAPDHR (BORGHESAN <i>et al.</i> , 2013)
Direto: 5'-CACCCGCGGTAATTCCAGC-3' Reverso: 5' -CTGAGACTGTAACCTCAA-3'	SSUrRNA V7V8 (BORGHESAN <i>et al.</i> , 2013)
Direto: 5'-CATCAGACGYAATCTGCCGC-3' Reverso: 5'-TTGGTCGCRCTTYTTTAGTCACAG-3'	SSU-rRNA Kineto_80 e Kineto_651 (GLASER <i>et al.</i> , 2014)
Direto: 5'-CTGCCAGTAGTCATATGCTTG TTTCAAGG A-3' Reverso: 5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTA CAGCT-3'	SSU-rRNA Kineto_14F/Kineto_2026 (VON DER HEYDEN <i>et al.</i> , 2004)
Oligonucleotídeos Iniciadores Universais	Alvos/Referências
Direto: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' Reverso: 5'-GATCCTTCTGCAAGGTTACCTAC-3'	SSU-rRNA EUK A/EUK B (KOID <i>et al.</i> , 2012)
Direto: 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATATA-3' Reverso: 5'-TGCTGTTACATGGAACCTTTC-3'	Large subunit rRNA LSU_25/LSU_1440 (JO <i>et al.</i> , 2011)
Direto: 5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3' Reverso: 5'-CACACTCCTTAGCGGA-3'	Large subunit rRNA LSU_1274/LSU_689 (MARKMANN & TAUTZ, 2005)
Direto : 5'- AATCTGGTTGATCCTGCCAG-3' Reverso : 5' -TGATCCTTCTGCAGGTTACCTA-3'	SSU – rRNA SSU18SF1/SSU18R1 (KATANA <i>et al.</i> 2001)
Direto: 5'-YGGAGARDSRGCYTGAKARAYGGC-3' Reverso: 5'-GACCTGKTATTGCCTYAMRCTTCC-3'	SSU – rRNA SSUint-1F/SSUint-1R (SNOEYENBOS-WEST <i>et al.</i> , 2002)
Direto: 5'-TCTACTAAyCATAAAGATATCGG-3' Reverso: 5'-ACGGTAAACATATGATGAGCCCAAAC-3'	COX 1 CoChry /COX1BR COX 1 (GROSSMAN <i>et al.</i> , 2016)

As condições da PCR dos alvos V7-V8 e gGAPDH foram as seguintes: o volume final da PCR foi de 50 µL, contendo: tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTPs); 1,5 mM de MgCl₂ 1 U de Taq DNA polimerase (DNA Platinum polimerase, Invitrogen Life Technologies, USA); 0,04% de albumina de soro bovino (BSA-Sigma Chem. Co., USA) e 3 uL do DNA extraído. As ampliações foram realizadas em 35 ciclos, com uma etapa de desnaturação inicial

de 94 °C/ 1 min, seguido de uma etapa de anelamento de 54 °C/ 2 min, e de extensão por 72 °C/ 2 min.

Para os demais alvos foram realizadas padronizações das concentrações de MgCl₂ (variando de 1,5 mM a 3,0 mM) assim como, gradientes de temperatura (50 °C a 65 °C) de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores.

Em todas as PCRs, antes do primeiro ciclo, foi realizada uma etapa de desnaturação inicial por 95 °C por 5 min e, após o último ciclo uma etapa de extensão final de 72 °C por 7 min. Em todas as PCR foram utilizados como branco da reação H₂O MilliQ no lugar do DNA molde.

4.7.3 Análise do produto amplificado por eletroforese

Para análise eletroforética, foram 7 µL do produto amplificado e 4 µL do tampão de amostra contendo 2 µL de *Gel Red* e 2 µL de tampão 6X DNA Loading Dye. Em cada gel, foi amplificado 5 µL de padrão de massa molecular (*DNA ladder* – Thermo Scientific de 100 pb e 1 kb). A análise por eletroforese foi feita em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris 1,1 M; Ácido Bórico 0,9 M; EDTA 25 mM, pH 8.3). Durante a corrida eletroforética, o gel foi submetido à 80 V por 40 min.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram visualizados no transluminador (UV transluminador, Major Science) e fotodocumentados com câmera digital. Os produtos amplificados do tamanho esperado e sem fragmentos inespecíficos foram purificados empregando o kit de purificação Illustra™ GFX (Ge Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante, e processados conforme descrito a seguir.

4.7.4. Reação de sequenciamento, alinhamento e análises filogenéticas

Os produtos purificados foram submetidos a reações de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, e posteriormente a reação foi enviada para a plataforma de sequenciamento PDTIS/ Fiocruz.

As sequências nucleotídicas obtidas em forma de cromatogramas foram analisadas no programa *DNASTAR SeqMan* (DNASTAR Inc., Madison, Wis WI) e editadas manualmente para a obtenção das sequências consenso. A primeira análise realizada com as sequências foi uma busca no banco de dados público *Genbank* através do alinhamento utilizando o servidor *BLAST 2.0 (Basic Local*

Alignment Search Tool) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) da Biblioteca Nacional de Medicina do NIH (*National Institute of Health*), Maryland, EUA (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências depositadas no *GenBank* que apresentaram elevados percentuais de identidades foram selecionadas para realizar o alinhamento através do algoritmo CLUSTAL W disponível no pacote do programa MEGA 5.1.

Para avaliar o grau de relacionamento genético entre as sequências obtidas foi empregado o método estatístico probabilístico, Máxima Verossimilhança (ML). Os modelos de substituição nucleotídica foram determinados a partir o programa jModelTest 0.1.1 (POSADA, 2008) com aplicação do critério de correção de Akaike.

4.8 Depósito dos isolados na Coleção de Protozoários da FIOCRUZ

Todos os isolados receberam código de entrada e foram depositados na coleção de protozoários da FIOCRUZ (COLPROT) sob os códigos COLPROT773, COLPROT774 e COLPROT841.

4.9 Procedimentos operacionais padrão (POP)

Os POPs elaborados são descrições detalhadas de cada procedimento individual realizado no fluxograma de trabalho da COLPROT. Trata-se de uma documentação que estabelece instruções sequenciais das regras, características e metodologia para o desenvolvimento das atividades técnicas. A elaboração dos POPs foi baseada nas normas da gestão da qualidade da FIOCRUZ (ABNT NBR ISO 9001:2008 - Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos (ABNT, 2015).

V. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico parasitológico dos esfregaços sanguíneos e das fezes de PNHs

Por meio da microscopia óptica não foi possível observar a presença de parasitos flagelados nas 60 amostras de esfregaços sanguíneos, assim como nas culturas de sangue analisadas. Das 60 amostras de fezes inoculadas em meio LIT, seis (10%) foram positivas para protozoários flagelados após uma semana de cultivo. Destas, uma foi isolada de *M. fascicularis*, duas de *M. mulatta* e três amostras de *S. sciureus*. Todavia das seis culturas, conseguimos a manutenção *in vitro* de apenas três culturas: uma cultura de *M. mulatta* e uma cultura de *S. sciureus* (Tabela 3).

Tabela 3: Dados consolidados das amostras de material fecal coletadas e analisadas para a presença de eucariotos unicelulares flagelados.

PNHs	Nº de amostras analisadas	Nº de culturas positivas	Nº de culturas estáveis
<i>M. fascicularis</i>	20	1	0
<i>M. mulatta</i>	30	2	2 (COLPROT773 – AG137-2 e COLPROT774 – AG137-1)
<i>S. sciureus</i>	10	3	1 (COLPROT841 – SS17)

As 60 amostras de material fecal foram inoculadas em meio de cultura LIT e suplementados com 10% SFB e observadas diariamente no microscópio ótico. Após 10 dias, as culturas negativas foram descartadas. Após a visualização de eucariotos unicelulares flagelados, foram realizadas as etapas de axenização, clonagem e criopreservação, conforme descrito na metodologia. Os números entre parêntesis indicam o tombamento das amostras na COLPROT.

5.2 Isolamento de protozoários e estabelecimento de cultivos (vide o POP-009)

As amostras isoladas neste estudo foram identificadas como AG137 e SS17, e são provenientes do material fecal de *M. mulata* e *S. sciureus*, respectivamente. Em ambas amostras foram observadas infecções mistas já que evidenciamos parasitos com morfologias distintas, sugerindo a presença de pelo menos dois flagelados diferentes. Desta forma, diluições seriadas foram realizadas para a obtenção de uma população clonal. Da amostra AG137, foram obtidas duas populações de parasitos (AG137-1 e AG137-2) a partir das diluições 1:10.000 e 1:100.000, que receberam o número de depósito oficial COLPROT774 e COLPROT773, respectivamente. Por sua vez, a partir da amostra SS17, foi obtido somente um clone, na diluição 1:100.000 (COLPROT841).

Durante o processo de axenização, as amostras AG137-1 e AG137-2 apresentaram uma redução da carga bacteriana quando cultivados na presença dos antibióticos Piperacilina/Tazobactam e Garamicina com a concentração que variou de 44 µg/µL a 88 µg/µL. Todavia, não obtivemos êxito na eliminação completa das bactérias, pois toda vez que a contaminação bacteriana era eliminada, o parasito não se mantinha estável na cultura. Nestas amostras o antifúngico Itraconazol apresentou uma ação fungistática e somente após o cultivo do parasito em tubo W por 72 h foi possível a eliminação dos fungos presentes na cultura. Desta forma, os isolados foram mantidos em cultivo do tipo poliaxênico (parasito/bactérias). Por sua vez, foi possível eliminar a presença de bactérias após a adição de 44 µg/µL de antibióticos Piperacilina/Tazobactam no meio de cultura contendo o isolado SS17. O cultivo em tubo W e o uso do antifúngico Itraconazol viabilizaram a eliminação fúngica, porém, o parasito não manteve uma cultura estável na ausência do fungo. Desta forma, o isolado SS17 é mantido em cultivo do tipo polixênico (parasito/fungo).

5.3 Padronização do processo de criopreservação dos isolados (Vide POP-011; 012; 013)

O isolado SS17 (COLPROT841) foi criopreservado em solução crioprotetora contendo meio de cultura LIT, 10% de SFB e 3% de metanol. Por sua vez, para as amostras AG137-1 (COLPROT774) e AG137-2 (COLPROT773), o percentual de metanol utilizado foi de 5%. O melhor resultado obtido na etapa de congelamento dos isolados foi da exposição gradual de temperatura (gelo picado/freezer/gelo seco/nitrogênio líquido). Nos testes com o DMSO e com o glicerol obtivemos uma

viabilidade de aproximadamente 10% da cultura, de modo que a maior viabilidade foi obtida nesse protocolo a 3% e 5% de metanol.

5.4 Padronização da técnica de coloração dos protozoários isolados (POP-010)

O protocolo de coloração que apresentou o melhor resultado foi o que usou o corante Giemsa diluído (1:50), como será observado nas imagens a seguir. Todavia, algumas vezes observamos alterações da integridade da membrana plasmática e vacuolização citosólica. Estas pequenas variáveis causam grande impacto na qualidade da coloração do material.

5.5 Caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular do isolado AG137-1 (COLPROT774) (Vide os POPs 002; 005; 007; 015; 017; 018)

5.5.1 Caracterização morfológica

Por microscopia óptica, observamos que o isolado AG137-1 possui dois flagelos emergindo da região anterior, sendo que um flagelo está aderido parcialmente na membrana da célula. A presença do núcleo e de uma estrutura similar ao cinetoplasto pode ser evidenciada na Figura 11C. Esta estrutura é característica marcante dos protozoários pertencentes a classe Kinetoplastea, e é utilizada como critério para classificação taxonômica.

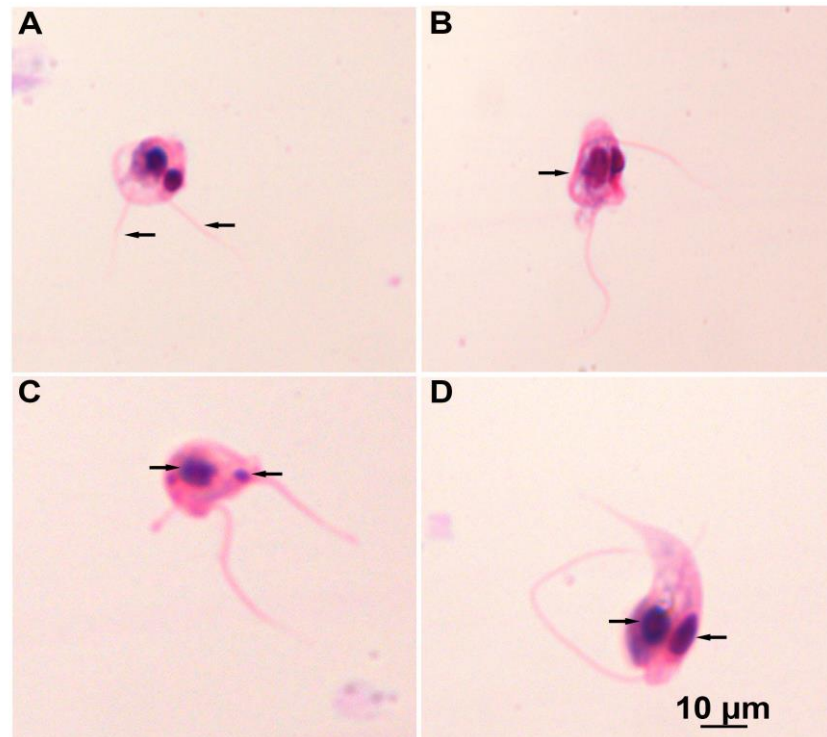


Figura 11: Isolado AG 137-1 (COLPROT774) corado com Giemsa. (A) As setas estão apontadas para os flagelos; (B) Flagelo parcialmente aderido na membrana (seta); (C) Cada protozoário apresenta apenas um cinetoplasto e um núcleo (setas, o cinetoplasto é a estrutura menor); (D) Notar a presença de dois núcleos (setas) em protozoário em processo de divisão.

Evidenciamos por meio da microscopia de fluorescência, marcações no cinetoplasto (DNA condensado), no núcleo (DNA nuclear) e no DNA de bactéria presente no interior do vacúolo (Figura 12A-C). Na análise ultraestrutural por meio da MEV (Figura 12D-G) evidenciamos a presença de dois flagelos, sendo que um encontra-se aderido ao corpo celular do protozoário (Figura 12F, seta branca) e o outro apresenta-se livre (Figura 12F-G, setas brancas). A superfície celular do protozoário apresenta um aspecto irregular com algumas bactérias aderidas (Figura 12F). Podemos evidenciar a bolsa flagelar, local de saída dos flagelos (Figura 12E) e a presença de dois orifícios na região anterior do corpo do protozoário (Figura 12D, seta preta).

O panorama interno do corpo celular com as estruturas citosólicas pode ser observado na MET (Figura 12H-L). Observamos a presença do núcleo, nucléolo, cinetoplasto, bolsa flagelar, localizada próxima ao cinetoplasto, mitocôndria, vacúolos citosólicos, além das bactérias em vacúolos e no meio extracelular (Figura 12H-L). Sendo assim, a análise ultraestrutural com a identificação de caracteres

típicos, como, o cinetoplasto, dois flagelos e a fagocitose de bactérias, sugere a classificação do isolado AG137-1 dentro do grupo dos bodonídeos.

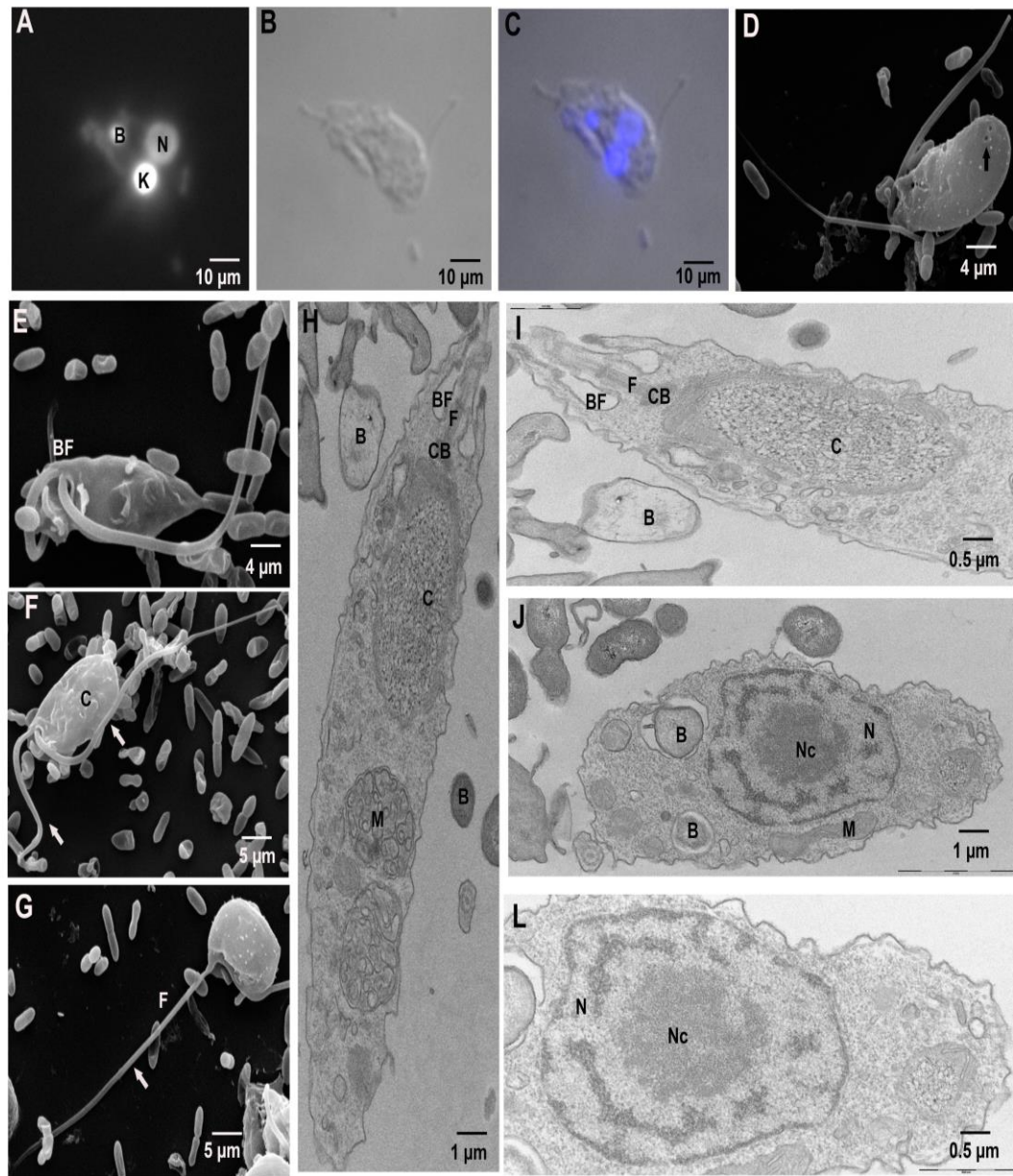


Figura 12: Micrografias do isolado AG137-1 (COLPROT774). Microscopia de fluorescência (A-C). A – marcação com DAPI indica o cinetoplasto (K), o núcleo (N) e uma bactéria (B), B – DIC, C – superposição das duas imagens. Microscopia eletrônica de varredura (D-G): (D) as setas indicam orifícios na região posterior do protozoário; (E) BF: região de saída da bolsa flagelar; (F) C: corpo celular com bactérias aderidas, a seta branca indica o flagelo aderido ao corpo e a seta branca o flagelo livre; (G) F: flagelo, a seta branca indica que o flagelo é livre. Microscopia eletrônica de transmissão (H-L): (H) corte longitudinal do isolado mostrando suas estruturas internas e as bactérias -B- no meio extracelular, (I) Notar o cinetoplasto (C) com o kDNA descompactado. (J) É possível observar bactérias -B- em vacúolos citosólicos e no meio extracelular. (L) Notar o núcleo -N- onde está presente um nucléolo -Nc- central. B: bactéria; BF: bolsa flagelar; C: cinetoplasto; CB: Corpo basal; F: flagelo; M: mitocôndria; N: núcleo; Nc: nucléolo.

5.5.2 Caracterização molecular (Vide os POPs 019; 020; 021; 022; 023; 024; 027; 028; 029; 030)

Uma etapa crucial deste trabalho foi padronizar as condições da PCR para os diferentes oligonucleotídeos iniciadores, bem como determinar quais iniciadores seriam específicos, isto é, apenas um produto amplificado e no tamanho esperado.

O DNA do isolado AG137-1 foi amplificado quando empregamos os iniciadores V7/V8 e gGAPDH. As PCRs para os alvos EukaA/EukB Kineto80F/651R e Kineto14/2026R foram padronizadas, ao final a concentração de MgCl₂ para o alvo EukaA/EukB foi de 1,5 mM e para os demais a concentração foi de 2,5 mM. As temperaturas de anelamento que demonstraram um maior rendimento na PCRs estão consolidadas na tabela 4.

Tabela 4: Ciclos de amplificações para os alvos 18S e gGAPDH

Alvos	Ciclo de amplificação
gGAPDH	Desnaturação: 94 °C/ 1min Anelamento: 54 °C/ 2 min Extensão: 72 °C/ 2 min.
18S - V7/V8	Desnaturação: 94 °C/ 30 seg Anelamento: 54 °C/ 2 min Extensão: 72 °C/ 2 min.
18 S - Kineto80/Kineto651	Desnaturação: 95 °C/ 45 seg Anelamento: 58 °C/ 30 seg Extensão: 72 °C/ 1 min.
18S - Kineto14F/Kineto2026R	Desnaturação: 94 °C/ 30 seg Anelamento: 63 °C/ 36 seg Extensão: 72 °C/ 1.5 min.
18S - EUKA/EUKB	Desnaturação: 94 °C/ 30 seg Anelamento: 53.8 °C/ 30 seg Extensão: 72 °C/ 2 min.

Os produtos amplificados pelas PCRs foram separados por eletroforese e visualizados pelo intercalante *Gel Red* através da exposição a raios ultravioleta (Figuras 13-15). A figura 13 mostra um produto único oriundo da reação de amplificação utilizando como DNA molde o isolado AG137-1, os fragmentos apresentaram o tamanho esperado para os alvos gGAPDH (~960 bp) e V7/V8 SSU rRNA (~800 pb). Anexo 1.

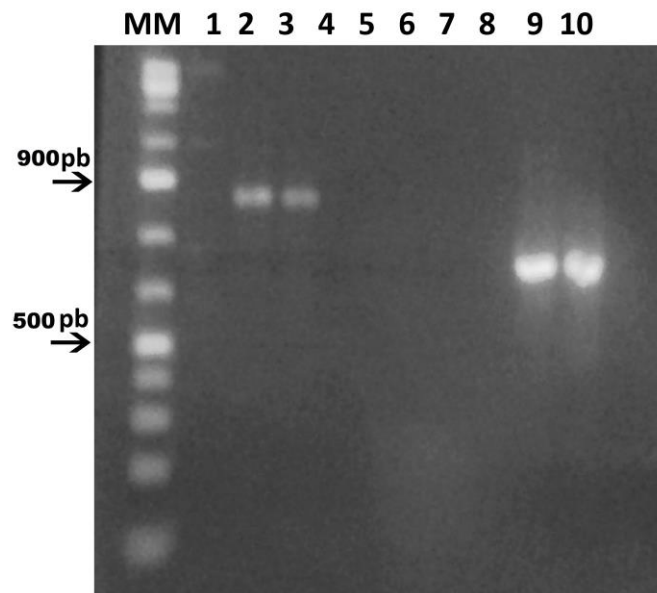


Figura 13: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados pelos iniciadores gGAPDH e 18S. (MM) Padrão de massa molecular 100 pb. (1) Branco; (2-3) DNA do isolado AG137-1 amplificado com os iniciadores para o alvo gGAPDH; (5-8) sem amostra, (9-10) produto da amplificado para o alvo V7/V8 rDNA.

A figura 14 ilustra a eficiência do iniciador para rRNA SSU universal de eucariotos, com bandas únicas e de tamanho variado, o que é esperado dado a diversidade dos organismos analisados: isolados AG137-1, AG137-2, SS17 (obtidos neste estudo) e controle positivo.

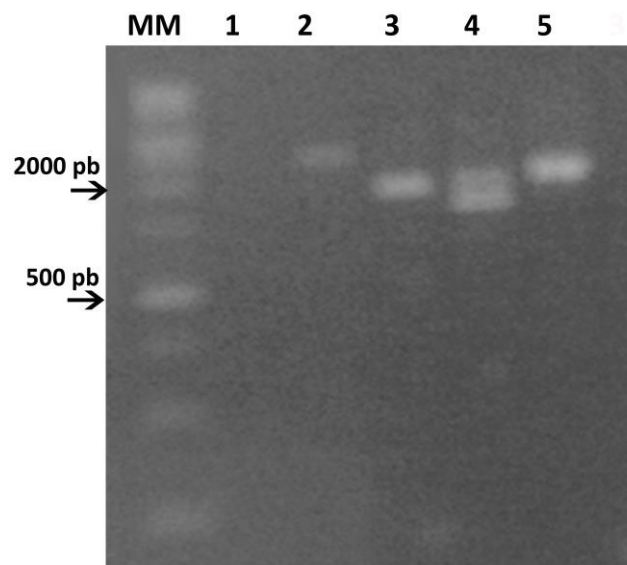


Figura 14: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados pelo iniciador universal de eucarioto para 18S (EukA/B). (MM) Padrão de massa molecular de 1 kb, (1) Branco; (2) Isolado SS17; (3) Isolado AG-137-2; (4) controle positivo; (5) isolado AG137-1

A figura 15 evidencia a obtenção de um produto único utilizando como molde o DNA do isolado AG137-1 e como iniciadores os oligonucleotídeos Kineto14F/Kineto2026R e Kineto80F/Kineto651R, que geraram produtos de aproximadamente 2000 pb e 800 pb, respectivamente.

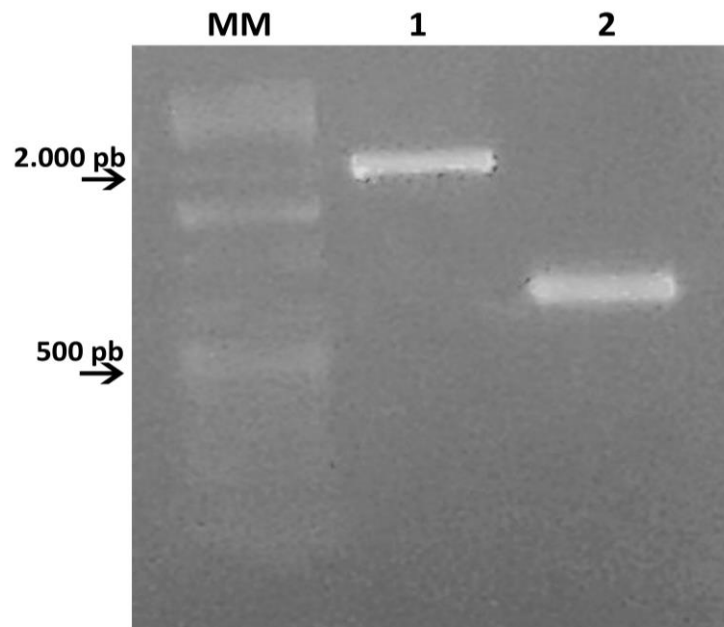


Figura 15: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados pelo iniciador universal de cinetoplastídeos para 18S (Kineto) (MM) Padrão de massa molecular 1kb, (1) DNA do isolado AG137-1 amplificado pelo iniciador Kineto 14F/kineto 2026R, (2) DNA do do isolado AG137-1 amplificado pelo oligonucleotídeo iniciador Kineto 80F/Kineto 651R.

Todos os fragmentos foram purificados e sequenciados. As sequências de DNA obtidas dos quatro produtos amplificados para o alvo 18S foram editadas concomitantemente gerando uma sequência consenso de 1960 pb (Anexo 1 e Figura 16).

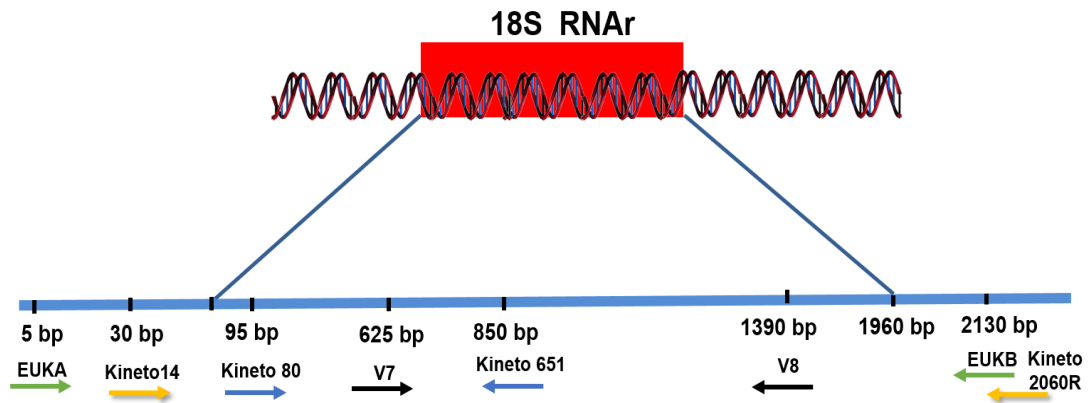


Figura 16: Montagem da sequência consenso dos alvos SSU-rRNA para o isolado AG137-1.

A sequência consenso foi submetida à ferramenta de alinhamento *BLAST* contra o banco de dados público de sequências *genBank*. A sequência do banco de dados que apresentou a maior cobertura e percentual de identidade com a sequência consenso foi uma sequência de *Bodo caudatus* (98%). Por sua vez, a sequência consenso de gGAPDH de 747 pb (Anexo 1) apresentou um percentual de identidade de 86% com *Parabodo caudatus* (Tabela 5).

Tabela 5: Percentuais de identidades do isolado AG137-1 (COLPROT774) obtido por meio da ferramenta BLAST/NCBI

Isolado	Alvo	Cobertura	<i>E-value</i>	Identidade (%)	Nº de acesso
AG137-1	SSU-rDNA	99%	0	98%	<i>Bodo caudatus</i> (AY028450.1)
	gGAPDH	100%	0	86%	<i>Parabodo caudatus</i> (DG915848.1)

O alinhamento obtido a partir da sequência do 18S do isolado AG137-1 com as sequências de bodonídeos disponíveis no *genBank* serviu de base para a seleção de sequências que foram incluídas na análise filogenética. A análise de máxima verossimilhança para o alvo 18S mostrou que o clado do isolado AG137-1 é próximo filogeneticamente de *Bodo caudatus* (sinonímia de *Parabodo caudatus*) (MAKIUCHI T *et al.*, 2008) com um percentual de *Bootstrap* (confiabilidade) de 84% (Figura 17).

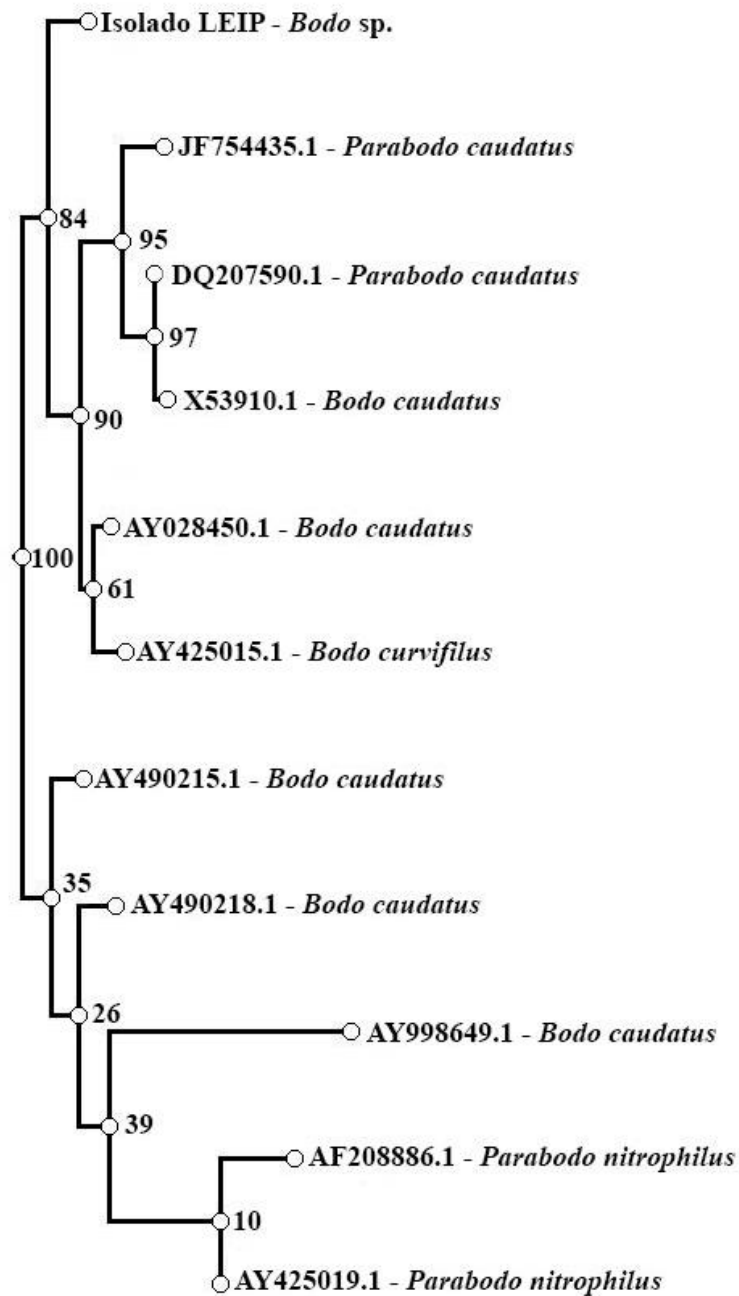


Figura 17: Árvore filogenética da sequência parcial do gene 18S do isolado AG137-1 (COLPROT774). Análise de máxima verossimilhança empregando a sequência parcial de 1.960 pb, o modelo evolutivo selecionado pelo critério de Akaike foi Tanura e Nei. Em cada ramo da árvore podemos observar o percentual de *Bootstrap*. O isolado AG137-1 está representado como isolado “LEIP *Bodo* sp.”

Por sua vez, para o alvo gGAPDH, observamos que o isolado AG137-1 (LEIP *Bodo* sp.) encontra-se proximamente relacionado com *Parabodo caudatus*, com um percentual de *Bootstrap* (confiabilidade do ramo) de 100% (Figura 18).

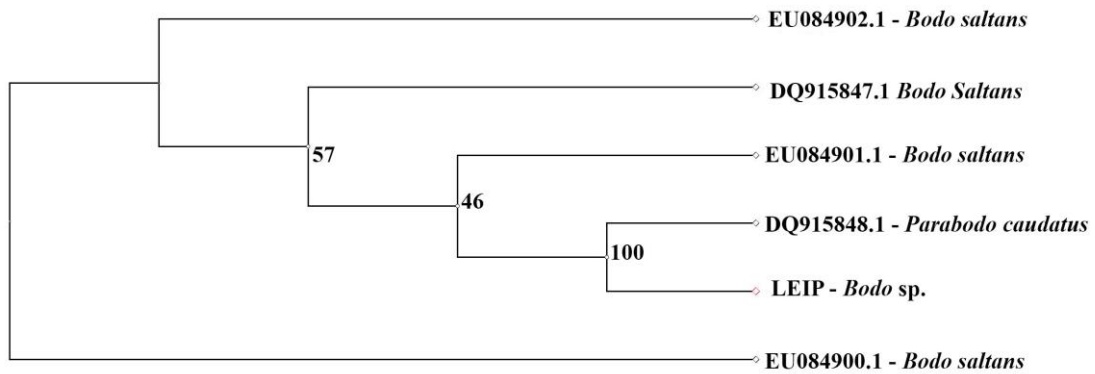


Figura 18: Árvore filogenética baseada na análise da sequência parcial do gene gGAPDH do isolado AG137-1 (COLPROT774). O método de reconstrução foi a máxima verossimilhança usando o modelo evolutivo de Tanura e Nei, de acordo com o critério de Akaike. Em cada ramo podemos observar o percentual de *Boodstrap*. O isolado AG137-1 está representado como isolado “LEIP *Bodo sp.*”

Podemos concluir através da abordagem polifásica que incluiu análises morfológicas e moleculares que o isolado AG137-1 representa uma nova espécie de cinetoplastídeo, que se posiciona entre os gêneros já descritos *Parabodo* e *Bodo*, e com características únicas que sustentam a proposição de um novo gênero.

5.6 Caracterização morfológica e ultraestrutural do isolado AG137-2 (COLPROT773) (Vide os POPs 002; 005; 007; 015; 017; 018)

Após a execução da técnica de coloração por Giemsa, observamos que o protozoário tem um formato alongado e possui dois flagelos. É possível evidenciar a presença de bactérias (setas), e a formação de rosetas, que em geral foi observada após 72 h de cultivo (Figura 19).

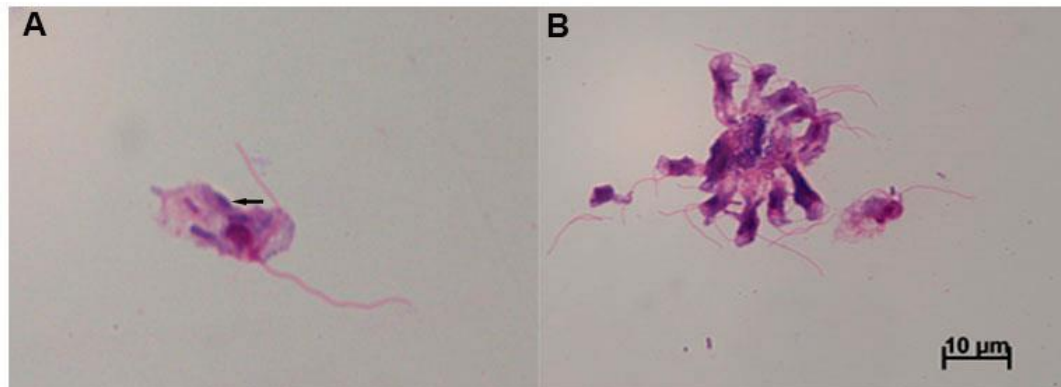


Figura 19: Microscopia óptica do isolado AG137-2 (COLPROT773), corado com Giemsa. (A) Protozoário apresenta um núcleo central e dois flagelos. A seta aponta para bactéria que está no citoplasma. (B): forma de roseta é observada na cultura.

Pela análise da microscopia de fluorescência podemos visualizar uma marcação intensa que permite identificar o núcleo na região anterior do protozoário. O núcleo apresenta uma fraca marcação com o DAPI o que sugere que o DNA está pouco compactado (Figura 20A-C).

Na análise ultraestrutural por MEV, observamos dois estágios evolutivos. O primeiro estágio apresenta formatos que variam de discoide a alongado, contendo dois flagelos livres (Figura 20D-E). O segundo, é uma forma arredonda, que provavelmente equivale a fase cística e que apresenta uma superfície com protuberâncias contendo um orifício. Este orifício encontra-se aberto e/ou fechado (Figura 20F-H). A figura 20I, pode representar um estágio de transição da forma flagelar para a cística. Por sua vez, na análise por MET podemos observar que este protozoário apresenta grandes vacúolos onde por vezes é possível observar bactérias. Estruturas semelhantes a corpos lipídicos estão localizadas próximas as mitocôndrias que exibem cristas. O núcleo apresenta nucléolo bem definido e DNA descompactado, como anteriormente sugerido por microscopia óptica de fluorescência (Figura 20J-N).

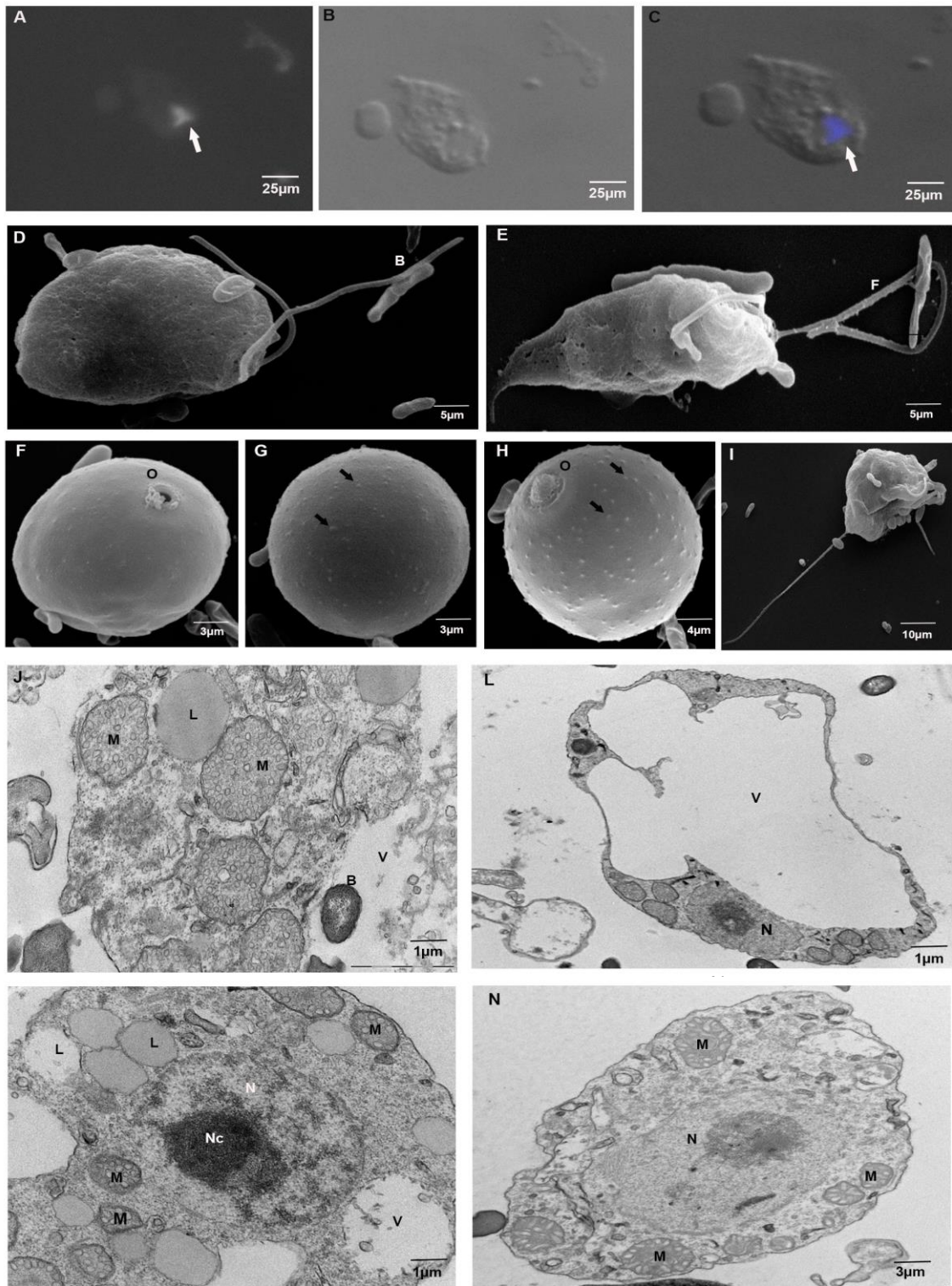


Figura 20: Micrografias do isolado AG 137-2 (COLPROT773). Microscopia de fluorescência (A-C). A – marcação com DAPI, B – DIC, C – superposição das duas imagens. A seta aponta a marcação do DNA nuclear com DAPI. Análises por MEV: (D-E) Forma flagelar, onde observa-se que o flagelo (F) auxilia na captura de bactérias (B). (F-I). Forma cística, em (F) o cisto apresenta orifício aberto (O); já em (H) o cisto apresenta orifício fechado. Em (G-H) é possível observar que a superfície celular contém protuberâncias (setas). Ultraestrutura celular observada por MET (J-N): Em (J) observamos mitocôndrias com cristas (M) próximas a corpos lipídicos (L) e também um vacúolo (V) contendo bactéria (B). Em (L) observamos o grande espaço ocupado pelo vacúolo. Em (M-N) observamos especialmente o núcleo (N) contendo o nucléolo (Nc) e um DNA pouco compactado.

5.7 Caracterização morfológica e ultraestrutural do isolado SS17 (COLPROT841) (Vide os POPs 002; 005; 007; 015; 017; 018)

Na análise morfológica por meio da microscopia óptica foi possível observar que o protozoário apresenta uma forma alongada e dois flagelos que emergem da região anterior do corpo celular onde se encontra o núcleo (Figura 21A-B).

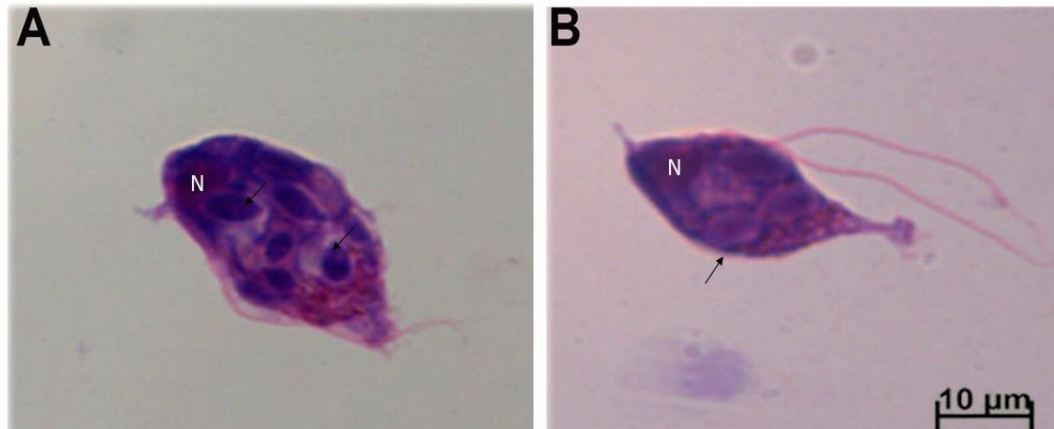


Figura 21: Microscopia óptica do isolado SS17 (COLPROT841) corado com Giemsa. (A-B) O protozoário apresenta dois flagelos e um núcleo (N) deslocado para a região anterior. É possível observar fungos em vacúolos citosólicos (setas).

Na microscopia de fluorescência, a marcação com DAPI permite observar o DNA nuclear do protozoário, assim como o DNA do fungo (Figura 22A-C).

Foi evidenciado por meio de MEV, que o isolado SS17, possui uma membrana de superfície rugosa (Figura 22D-G). O isolado possui cinco flagelos sendo que dois flagelos são longos e três curtos (Figura 22D-E). Por sua vez, na análise por MET, podemos observar a presença de vacúolos contendo fungos inteiros e digeridos (Figura 22H-M).

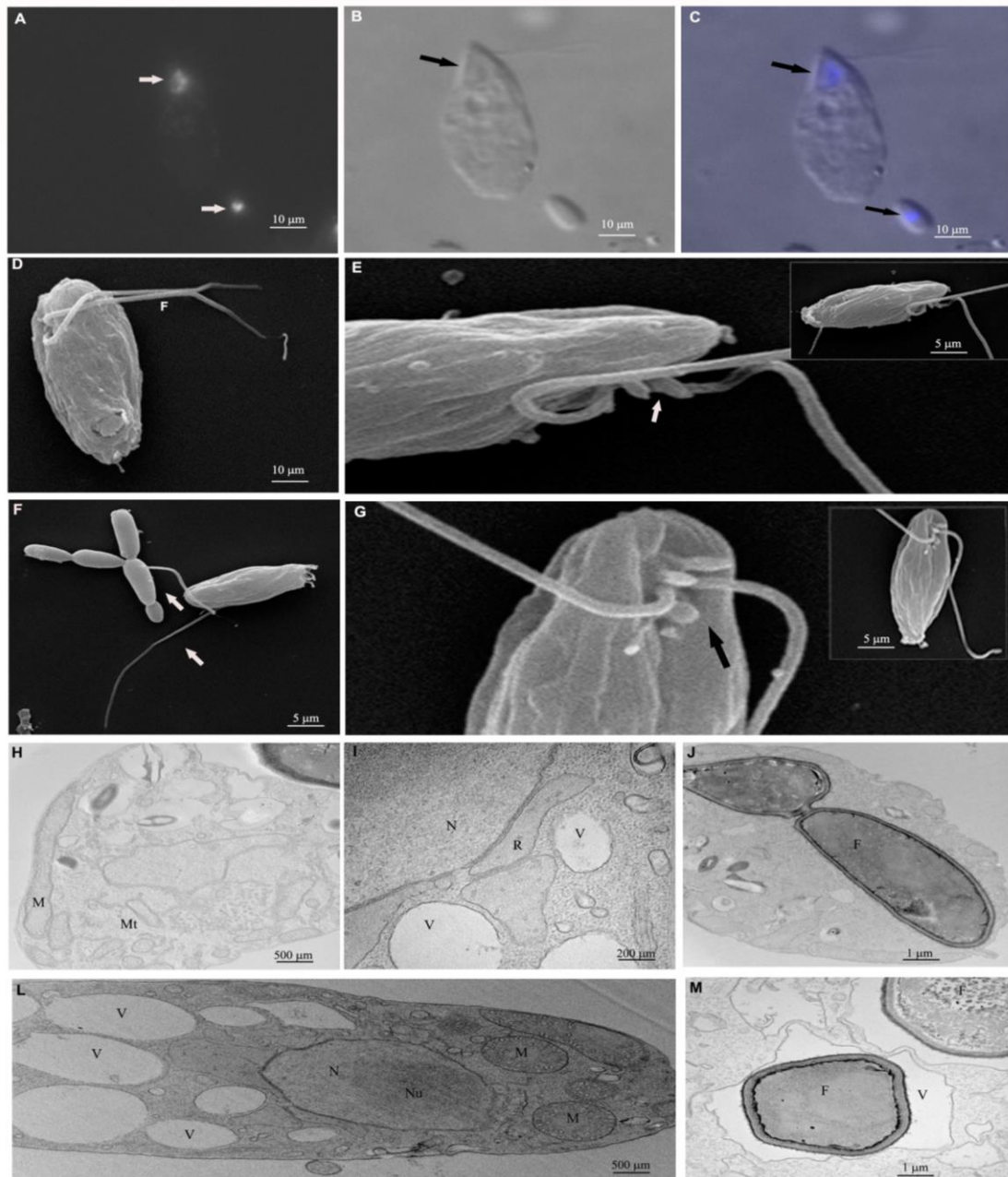


Figura 22: Micrografias do isolado SS17 (COLPROT841). Microscopia de fluorescência do parasito SS17 (A-C). Em (A) observamos a marcação com DAPI, a seta maior aponta para o DNA nuclear e a seta menor para o DNA contido no fungo; (B) DIC, notar que o núcleo fica localizado na região anterior do corpo celular (seta); (C) superposição das duas imagens onde as setas indicam o DNA nuclear (seta maior) e o DNA do fungo (seta menor). Imagens obtidas por MEV (D-G). Em (D) é possível observar que o protozoário apresenta dois flagelos longos, já em (E) pode-se notar a presença de apenas dois flagelos curtos (seta), os três flagelos curtos só podem ser observados em (G). Em (F) é possível observar que os fungos estão aderidos no flagelo, indicando que esta estrutura é usada para captura. Em (E-F), os insets mostram a visão geral dos protozoários que tiveram a região dos flagelos curtos observadas. Ultraestrutura celular analisada por MET (H-M): Em (H) uma visão do citoplasma onde observamos mitocôndrias (M), e uma região contendo microtúbulos (Mt). Em (I) observamos parte do núcleo (N) junto a uma estrutura similar ao retículo endoplasmático (R). Vácuolos (V) também são visualizados. Em (J e M) um vacúolo contendo um fungo (F). Em (L), um corte longitudinal permite observar diferentes estruturas citosólicas como o núcleo (N) que contém o nucléolo central e DNA pouco compactado.

5.8 Caracterização molecular dos isolados AG137-2 (COLPROT773) e SS17 (COLPROT841) (Vide os POPs 019; 020; 021; 022; 023; 024; 025; 026; 027; 028; 029; 030)

Os DNA dos isolados AG137-2 e SS17 não foram amplificados quando empregamos os iniciadores V7/V8, gGAPDH, Kineto80F/651R, Kineto14/2026R e COX1. Porém, logramos sucesso na amplificação dos alvos, quando empregamos iniciadores universais para eucariotos como EukA/EukB, LSU_25F/1440R, LSU_1274F/ 689R e SSU18SF1/SSU18R1 (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados obtidos nas PCRs empregando diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores

Oligonucleotídeos	AG-137-2	SS 17
V7/V8	PCR negativo	PCR negativo
gGAPDH	PCR negativo	PCR negativo
Kineto 80F/Kineto 651R	PCR negativo	PCR negativo
Kineto 14F/Kineto 2026R	PCR negativo	PCR negativo
Cox 1	PCR negativo	PCR negativo
EukA/EukB	PCR/Seq positivo	PCR/Seq positivo
LSU_25F/1440R	PCR/Seq positivo	PCR/ Seq positivo
LSU_1274F/689R	PCR/ Seq positivo	PCR/Seq positivo
SSU18SF1/SSU18R1	PCR/ seq positivo	PCR /Seq positivo

A Tabela 7 resume as condições de ciclagem padronizadas para cada par de iniciadores.

Tabela 7: Ciclos de temperaturas das PCRs após a etapa de padronização das reações

Alvo 18S	Ciclo de amplificação
EUKA/EUKB	Desnaturação: 94 °C/ 30 seg Anelamento: 53.8 °C/ 30 seg Extensão: 72 °C/ 2 min
LSU_25/LSU_1440	Desnaturação: 94 °C/ 1 min Anelamento: 58.5 °C/ 2 min Extensão: 72 °C/ 3 min
LSU_1274/LSU_689	Desnaturação: 94 °C/ 45 seg Anelamento: 58 °C/ 1 min Extensão: 72 °C/ 1 min
SSU18SF1/SSU18R1	Desnaturação: 94 °C/ 1 min. Anelamento: 58 °C/ 1 min Extensão: 72 °C/ 3 min.

Os produtos amplificados para os alvos EuKA/EukB, 18S, LSU 25/1440 e LSU 1275/689 dos isolados AG137-2 e SS17 podem ser visualizados no gel de agarose a 1,5% (Figura 23).

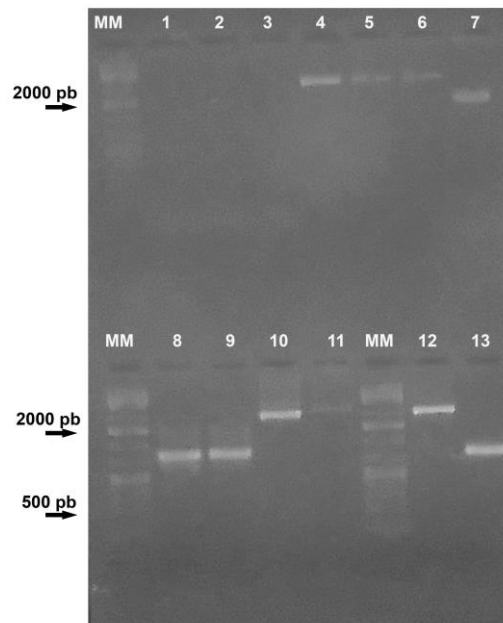


Figura 23: Gel de agarose a 1,5% dos produtos amplificados para o alvo 18S por diferentes oligonucleotídeos iniciadores. MM: Padrão de massa molecular, 1kb. 1-3: Negativo; 4 - DNA de SS17 amplificado por Euka/B; 5-6: DNA de AG137-2 amplificado por 18S; 7 - DNA de AG137-2 amplificado por LSU 25/1440; 8-9: DNA de SS17 amplificado por LSU-25/1440. 8-9: DNA de SS17 amplificado por LSU 1275/689; 10: DNA de SS17 amplificado por 18S; 11: DNA de SS17 amplificado por LSU 25/1440; 12 e 13 mostram o controle positivo (DNA do isolado AG137-1) das reações de PCR com os iniciadores Kinetu.

Em seguida, os produtos foram purificados e submetidos às reações de sequenciamento. Para o isolado SS17, duas sequências de DNA foram obtidas a partir dos produtos amplificados com os iniciadores EukA/EukB e SSU18SF1/SSU18R1 de tamanhos de 610 pb e 520 pb respectivamente (Anexo 2). As sequências foram editadas separadamente, pois não houve a sobreposição dos fragmentos. Todavia, as duas sequências consenso parciais apresentaram percentuais 100% de identidade com a sequência de *Cholamonas cyrtodiopsisidis* (FJ973364.1) através da busca em banco de dados empregando o programa *BLAST*. Por sua vez, as sequências obtidas para o isolado AG137-2 dos produtos amplificados com os iniciadores EukA/EukB e SSU18SF1/SSU18R1 permitiram a obtenção de uma sequência consenso de 1658 pb (Anexo 3) que apresentou um percentual de identidade de 94% com diferentes microrganismos conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 8: Percentuais de identidades do isolado AG137-2 e SS17 obtido por meio da ferramenta BLAST/NCBI

Isolado	Região alvo	Cobertura	E-value	Identidade (%)	Nº de acesso
SS17	18S	100%	0.0	100%	<i>Cholamonas cyrtodiopsisidis</i> (FJ 973364.1)
AG137-2	18S	97%	0.0	94%	<i>Spumella like</i> (EF043285.1), <i>Chrysophyta</i> sp (EF633325.1) e amostra não cultivada de <i>Stramenopile</i> (JQ782092.1)

O alinhamento obtido da sequência do isolado SS17 com as sequências disponíveis no *genBank* serviu de base para a seleção de sequências para a inferência filogenética. Na análise de máxima verossimilhança, evidenciamos que o isolado SS17 compartilha o mesmo clado com a sequência de *Cholamonas cyrtodiopsisidis* (Figura 24). Podemos concluir através da abordagem polifásica que incluiu análises morfológicas e moleculares que o isolado SS17 representa um isolado de um protozoário que nunca foi isolado e descrito formalmente.

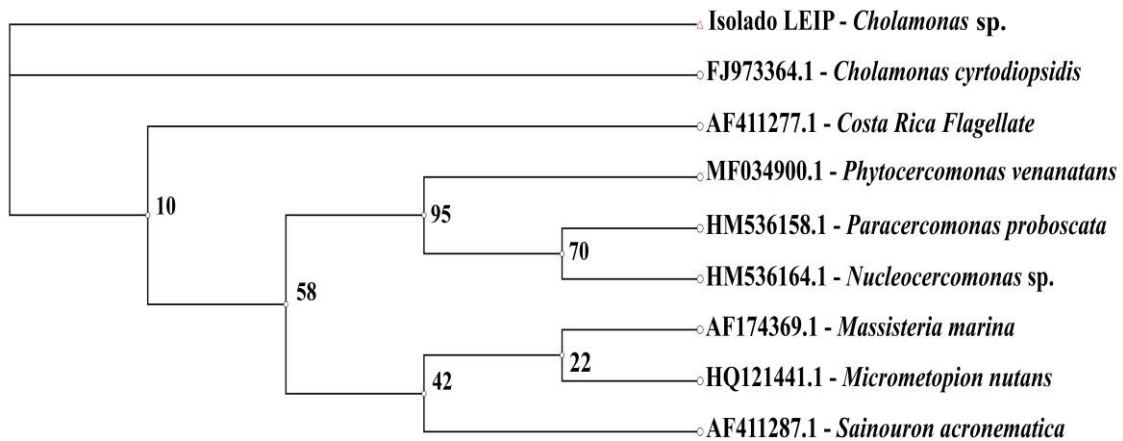


Figura 24: Árvore filogenética baseada na análise da sequência parcial do gene 18S do isolado SS17 (COLPROT841). O método de reconstrução foi máxima verossimilhança usando o modelo evolutivo Tanura e Nei, de acordo com o critério de Akaike. Em cada ramo podemos observar o percentual de *Bootstrap*. O isolado SS17 está representado como isolado “LEIP *Cholamonas* sp.”

5.9 Padronização do processamento de novos depósitos

Um total de trinta POPs foram redigidos de acordo com o manual da qualidade da FIOCRUZ. Os POPs abrangem desde o isolamento, preservação e identificação das amostras para depósitos (Anexo 4-34). Estes POPs foram validados pela curadora e vice-curadora da Coleção de Protozoários da Fiocruz e serão formalmente registrados, de acordo com as normas internas de gestão da qualidade da Fiocruz. Além disso, foi elaborado um fluxo de trabalho de acordo com a amostras analisadas. A autenticidade das amostras depositadas com informações taxonômicas preliminares e/ou definitivas seguirá uma análise padrão. O espécime que se enquadrar como um isolado a ser descrito ou com taxonomia incerta, terá a sua autenticidade reavaliada por meio da abordagem polifásica, descrita detalhadamente nos 30 POPs elaborados (Figura 25 e anexo 4-34).

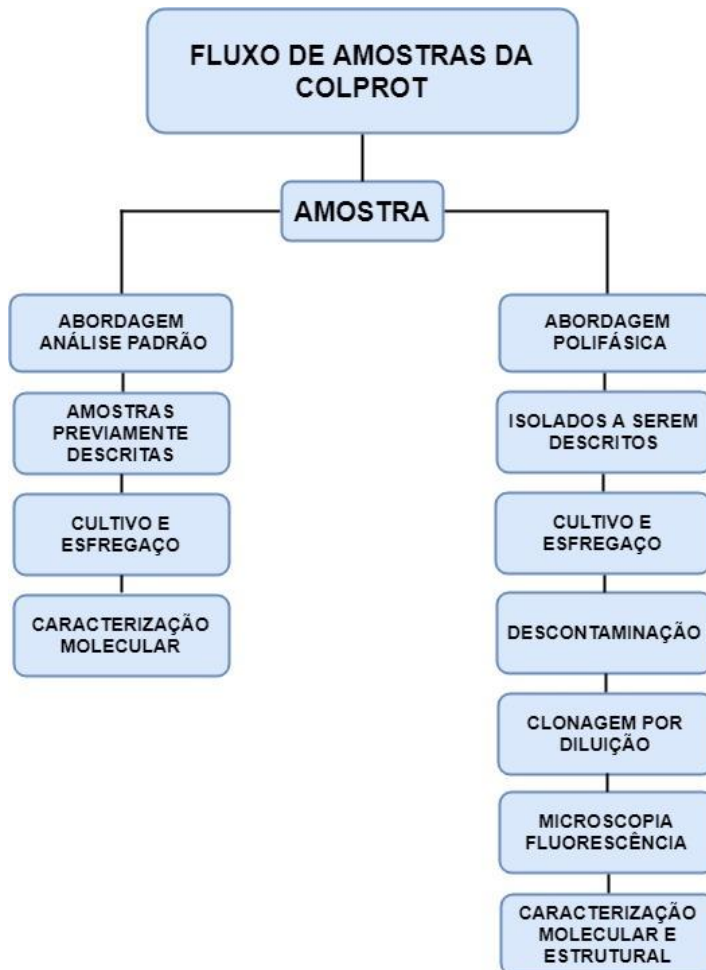


Figura 25: Fluxograma organizacional de trabalho das amostras

Esta padronização foi consolidada após a elaboração das diversas etapas que envolvem a obtenção de novos isolados de protistas.

VI. DISCUSSÃO

As coleções microbiológicas constituem patrimônios valorados para a pesquisa científica. Atuam como salvaguarda da conservação *ex situ* da biodiversidade e como provedores de materiais biológicos certificados e como fornecedores de informações associadas indispensáveis ao desenvolvimento da ciência e da tecnologia (ABNT, 2017). Para resguardar a sua missão mantenedora com excelência, as coleções biológicas precisam satisfazer os requisitos básicos da garantia da qualidade. O material biológico é tratado, conservado e documentado de acordo com normas e padrões que garantam a segurança, acessibilidade, longevidade, rastreabilidade, integridade dos dados da coleção, pertencente à instituição de ensino e/ou pesquisa (VPPCB, 2018). Vários são os requisitos para a obtenção da garantia da qualidade. Como preâmbulo temos que aplicar as normas da ABNT NBR ISO/IEC 17025 e as diretrizes da OECD de boas práticas para centros de recursos biológicos fundamental para avaliação da conformidade (OECD, 2007). Estas diretrizes aglutina os fundamentos e as boas práticas dos sistemas de gestão da qualidade e diretrizes operacionais, direcionadas para coleções de serviço públicas nacionais individuais, e organizações nacionais, regionais e mundiais de coleções de cultura. O reconhecimento da Conformidade aos Princípios das boas práticas de laboratório, cujos requisitos devem ser implementados e avaliados baseado na norma no nit-dicla-061 (INMETRO, 2015).

Indubitavelmente, a qualidade só pode ser estabelecida, promovida e assegurada por profissionais altamente qualificados e treinados. Esta dissertação contribuiu para elevar o padrão de qualidade da Coleção de Protozoários da Fiocruz através de um tripé: qualificação do corpo técnico, estabelecimento de procedimentos operacionais padrão e enriquecimento do acervo através da obtenção de isolados que representam unidades taxonômicas inéditas (WFCC, 2010).

A COLPROT é um patrimônio institucional que repercute na visibilidade externa chancelada pela sua importância histórica e cultural. É um repositório de células vivas que atua tanto como fiel depositária quanto como responsável pela aquisição, caracterização, autenticação, preservação e pela distribuição de protozoários, conformidade assegurada. Para tanto, a COLPROT deve cumprir os requisitos básicos exigidos pela documentação interna da FIOCRUZ (manual de coleções),

pelas diretrizes da OCDE e pela norma no NIT-Dicla-061/INMETRO (INMETRO, 2015). Ao realizar todos estes processos, a COLPROT promove a capacitação de recursos humanos e também estimula a difusão científica pela conservação da biodiversidade.

Nos últimos anos, a expansão do acervo e a promoção da garantia da qualidade têm sido as principais metas na reestruturação da COLPROT. A padronização adequada e transversal de todos os processos propicia a melhoria contínua dos serviços ofertados e dos requisitos que envolvem a garantia da qualidade. É imprescindível que as coleções busquem a melhoria do seu acervo, estabelecendo e seguindo normas e padrões que garantam a segurança, acessibilidade, qualidade, longevidade, confiabilidade, rastreabilidade, integridade e interoperabilidade dos seus acervos (ARANDA, 2014). Todavia, o processo de reestruturação não perpassa somente a expansão numérica do acervo de microrganismos cultiváveis. Futuramente partes replicáveis dos espécimes, como por exemplo, o fornecimento de DNA genômico, de dados contendo informações morfológicas, moleculares e ultraestruturais relevantes, estarão disponíveis para os usuários, principalmente para espécies não descritas ou para protozoários com taxonomia incerta.

No presente estudo, foram elaborados 30 procedimentos operacionais padrões, que constituem documentos organizacionais que traduzem os processos executado na COLPROT. São descrições detalhadas que permitem mapear os processos que objetivam a identificação acurada e a preservação dos organismos relevantes ao escopo da coleção. A padronização dos processos visa não somente a execução das atividades com um elevado padrão de qualidade, mas também o registro formal da competência da coleção. Além disso, é um requisito básico no processo de acreditação da coleção frente a órgãos reguladores nacionais e internacionais (INMETRO, 2015).

Nos últimos anos, houve uma revolução literária no que diz respeito a taxonomia dos protozoários. Se antes a classificação se baseava especialmente nas características morfológicas, hoje em dia não podemos desprezar a precisão das informações oferecidas pelo sequenciamento do DNA. Atualmente, a identificação taxonômica dos microrganismos perpassa por uma abordagem integrativa que usa técnicas com abordagens morfológicas/ultraestruturais e também ferramentas moleculares (VOTYPKA *et al.* 2015 e d'AVILA-LEVY *et al.*, 2016).

O acervo da COLPROT advém da prestação de serviços por meio de depósitos de diversas procedências e pela busca ativa por novos isolados provenientes de expedições em trabalho de campo realizada pela sua equipe. Após a obtenção do registro e número de identificação da COLPROT, avalia-se a autenticidade do espécime. Como são formas diferentes de aquisição e tipos de amostras diversas e complexas, este estudo delineou o fluxo de trabalho para isolamento, descontaminação, preservação, identificação e depósito das amostras.

A autenticidade das amostras depositadas com informações taxonômicas preliminares e/ou definitivas seguirá uma análise padrão. Esta análise, segue a seguinte ordenação: (i) avaliação do crescimento, (ii) observação da diferenciação morfológica em meio de cultura e no esfregaço corado por Giemsa, (iii) identificação molecular por meio das técnicas de PCR/sequenciamento. Por sua vez, o espécime que não se enquadrar como um isolado ou espécie já descrito ou no caso do protozoário apresentar taxonomia incerta, a autenticidade da amostra em questão é reavaliada. Neste caso, pode ser usada uma abordagem polifásica, que inclui além das já citadas anteriormente, a marcação do DNA (nuclear e do cinetoplasto) com intercalante de DNA fluorescente (DAPI), além das análises filogenéticas e ultraestruturais por microscopia eletrônica. Para os isolados obtidos de expedições em trabalho de campo se acrescenta as etapas de cultivo, clonagem por diluição e descontaminação, e estabelecimento da estratégia de sucesso de criopreservação.

Geralmente, no processo de criopreservação dos parasitos flagelados, os crioprotetores mais empregados são o glicerol e o DMSO. Para ordem Eubodonida e flagelados de taxonomia incerta é normalmente utilizado o DMSO a 10% (NERAD & DAGGETT, 1992). Todavia, a criopreservação dos três isolados obtidos neste estudo só foi conseguida em metanol a 5%. Em relação a coloração permanente dos isolados, a técnica de Giemsa foi a que apresentou melhores resultados, entretanto observamos pequenas deformações na membrana e algumas estruturas internas não puderam ser visualizadas. Todavia, esta é a técnica mais empregada para a identificações de protozoários flagelados (LIMA *et al.*, 1992).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV) são importantes ferramentas para a pesquisa de microrganismos, pois permitem o estudo detalhado da morfologia celular com alta resolução. Com a MET é possível observar de modo detalhado a organização celular, assim como as estruturas internas de uma célula com uma resolução não alcançada pela microscopia óptica.

Por sua vez, a MEV permite a observação de características gerais da superfície celular e a possibilidade de determinar com exatidão o tamanho de organismos unicelulares, tais como protozoários (de SOUZA, 2008).

Os estudos sobre biodiversidade parasitária que empregam técnicas independentes de cultura (detecção de DNA pela PCR/Sequenciamento, fingerprint e metagenômica) registram a abundância dos microrganismos e tentam estabelecer o papel deles no nicho pesquisado (SANTIAGO-RODRIGUEZ *et al.*, 2016). A detecção de DNA de cinetoplastídeos em fezes de PNHs, por exemplo, reporta a existência de protozoários no microbioma intestinal (HAMAD *et al.*, 2015; JIRKU *et al.*, 2015; VOTÝPA *et al.*, 2018). Estudos que usam como alvo o DNA 18S têm revelado um cenário composto por uma abundante diversidade de microrganismos ainda não cultivados e não estudados em laboratório (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2016). Na maioria das vezes, são estudos fragmentados pois dependem de um banco de dados de DNA robusto ainda não existente. Principalmente para novos isolados, os bancos de DNA serão sempre deficitários no que diz respeito a informações de sequências de DNA a nível de espécie. A grande fragilidade destes estudos está na utilização de iniciadores considerados universais para a amplificação por PCR. Isto porque, muitas vezes o produto gerado é um artefato e também porque o alvo molecular escolhido é uma sequência conservada entre as espécies conhecidas. Desta forma, esta técnica tem caráter informativo, mas não resolutivo no que diz respeito a identificação dos microrganismos, como evidenciado na amostra SS17.

Por sua vez, os estudos de metagenômica revelam a abundância e as funções dos microrganismos, mas neste caso, existe uma clara desproporção entre o conhecimento da diversidade de protozoários em relação ao de bactérias (HANDELSMAN, 2004). Tal desproporção está intimamente ligada a complexidade dos genomas dos eucariotos, necessitando de ferramentas computacionais robusta para sua análise.

O estudo da diversidade empregando técnicas independentes de cultura gera informações estáticas e não dinâmicas quando comparadas aquelas obtidas com microrganismos isolados. Sabemos que o isolamento *in vitro* não reflete necessariamente as complexas interações que ocorrem entre a vasta diversidade de microrganismos na natureza. Entretanto, este é um procedimento que permite análises mais profundas sobre o isolado em questão, sejam elas de caráter bioquímico, estrutural, fisiológicos ou ainda filogenético e evolutivo.

A elaboração deste fluxo de trabalho baseou-se na investigação da biodiversidade parasitológica de primatas não humanos (PNH) do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz). Nos resultados obtidos, podemos observar que quando estamos diante de um isolado previamente descrito na literatura, a análise padrão é suficiente para identificá-lo. As análises morfológicas do isolado AG137-1, por esfregaço corado com Giemsa mostraram microrganismos contendo estruturas semelhantes presentes em bodonídeos (dois flagelos, núcleo e cinetoplasto). A identificação deste isolado como um protozoário filogeneticamente próximo a *Bodo* sp., e que representa uma nova unidade taxonômica, foi baseada nas suas características morfológicas e ultraestruturais, realizadas por técnicas de microscopia, e também por meio do sequenciamento parcial do rDNA.

Os outros dois isolados estudados (SS17 e AG137-2) permitiram delinear uma estratégia de fluxo de trabalho para lidar com protozoários não descritos. Inicialmente, foram feitas as análises morfológicas que indicavam classificação no grupo dos cinetoplastídeos. Todavia, as marcações do DNA com o DAPI não revelaram a presença do cinetoplasto nestes protozoários. Esta abordagem usando o intercalante de DNA, mostrou ser uma ferramenta importante para a diferenciação entre seres flagelados do grupo dos cinetoplastídeos dos outros flagelados de vida livre (ordem Cercomonadida) (CAVALIER-SMITH, 2002; MYL'NIKOV & KARPOV, 2004; VICKERMAN *et al.*, 2002), visto que existe uma grande similaridade morfológica entre estes dois grupos. Paralelamente, as análises ultraestruturais de ambos os isolados revelavam características compatíveis com o grupo dos protistas. Todavia, para o isolado SS17, as análises moleculares das duas sequências parciais obtidas (520 bp e 602 bp para o alvo rDNA) apresentaram percentuais de identidade de 99% e de 100% com a sequência de *Cholamonas cyrtodiopsis* (FJ973364).

O gênero *Cholamonas* possui um único representante descrito até o momento, *C. cyrtodiopsis*. Este protozoário foi isolado do intestino posterior da mosca *Cyrtodiopsis dalmanni* e mantida em cultivo monoxênico com *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC® 50325). Este microrganismo foi descrito em 2002, após o crescimento em meio de cultura 802 por 48h, as análises por MEV e MET revelaram que *C. cyrtodiopsis* apresenta dois flagelos emergentes e dois flagelos curtos, membrana plasmática irregular e mitocôndrias com cristas paralelas ao longo eixo da célula (FLAVIN *et al.*, 2000). O isolado SS17 é mantido em meio LIT, cultivo

monoxênico com fungo (*Candida* sp.) e apresenta um pico de crescimento em 48 h. Possui uma membrana plasmática irregular, dois flagelos visíveis e três curtos que foram evidenciados somente após a análise comparativa com os dados de ultraestrutura de *C. cyrtodiopsisidis*. Desta forma, o dado molecular foi suplementado pela análise ultraestrutural tornando a identificação deste isolado mais robusta e confiável.

Em contrapartida, para o isolado AG131-2, a sequência parcial (1646 bp para o alvo rDNA) obtida apresentou um percentual de identidade de 94% com as sequências de *Spumella-like* (EF043285), *Chrysophyta* sp. (EF633325), entre outros microrganismos. Estes protozoários possuem flagelos longos ou curtos e apresentam características compatíveis com algas (GROSSMAN *et al.*, 2016; MEDLIN *et al.*, 2000). Tal discrepância entre os resultados pode ser justificada devido à escassez de sequências nos bancos de DNA. Trata-se de um tipo de protozoário pouco estudado e 7% de divergência em uma sequência de mais de 1.500 pares de base para um alvo conservado, como o rRNA 18S, dá margem a especulação de estarmos trabalhando com microrganismos que ainda não foi descrito, nem mesmo isolados próximos que poderiam descrever características do grupo taxonômico.

A diversidade eucariótica em PNHs tem sido pouco estudada no que diz respeito ao isolamento e caracterização de microrganismos flagelados. Nos últimos anos, vários estudos têm investigado a diversidade do microbioma intestinal de PNHs, utilizando o exame parasitológico de fezes (EPF), coprocultura e técnicas independentes de cultivo (detecção de DNA pela PCR, fingerpring e metagenômica). A importância destes estudos transita não somente no contexto da biologia animal, como também pelo fato que os PNHs são considerados modelos experimentais relevantes do ponto de vista biológico para seres humanos (elevado grau de homologia genética e similaridades fisiológicas e bioquímicas) (KAUP & SCHWIBBE, 2002).

As fezes são materiais de extrema complexidade, no que diz respeito ao isolamento e axenização de sua microbiota eucariótica. O cultivo *in vitro* de microrganismos obedece a requisitos básicos, como a utilização de um meio com aporte nutritivo e condições físico-químicas adequadas para seu desenvolvimento. Aliado ao pouco conhecimento, existe ainda, uma relativa escassez de material de referência disponível em coleções, e até mesmo de sequências de DNA de espécies

correlatas. O grau de dificuldade para o isolamento e axenização aumenta ainda mais quando se trata de seres vivos desconhecidos. Além disso, não existe um protocolo para cultivo de flagelados em fezes de mamíferos. No presente estudo, o meio LIT utilizado na coprocultura forneceu aporte nutritivos para o isolamento de três protozoários flagelados de vida livre. Todavia, durante a etapa de estabelecimento do cultivo nos processos de axenização, coloração e criopreservação houve dificuldades que exigiram a variação de parâmetros. Os isolados AG137-1 e AG137-2, são mantidos em cultivo polixênico com bactérias. A retirada de bactérias do meio após a utilização de diferentes classes de antibióticos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas acarretou frequentemente na morte dos isolados. Por sua vez, a cultura de *Cholamonas* sp. (SS17) foi estabelecida em cultivo monoxênico com fungo, pois a sua eliminação por meio do Tubo W inviabilizou o crescimento do protozoário.

Rotineiramente, o Serviço de Criação de Primatas Não Humanos (SCPrim) do ICTB/Fiocruz realiza o controle sanitário empregando entre os métodos, o EPF. A diversidade parasitária revelada pelo EPF mostra que os PNHs são susceptíveis a inúmeros parasitos que acometem o ser humano, demonstrando ser um modelo ideal para investigar doenças infecto-parasitária. Inicialmente, neste estudo, por meio do EPF, os PNHs foram diagnosticados com *Balantidium coli*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba* sp., *Blastocystis* sp., oocistos de coccídeos, tricomonádídeos e também com ovos e larvas de helmintos (HLC Santos, dados não publicados, comunicação pessoal). Além disso, a diversidade parasitária dos PNHs também foi avaliada pela coprocultura dirigida para protozoários flagelados, e também pela observação prévia de microrganismos com características similares ao da classe Kinetoplastea, como evidenciado pelo EPF. Estudos recentes têm reportado a presença de DNA de tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanossoma* (*Leishmania major* e *Trypanossoma brucei*) em amostras fecais de PNHs domiciliados em reservas biológicas localizadas na África. Neste caso, a identificação foi feita por PCR/Sequenciamento utilizando iniciadores para os alvos SSU-rDNA e ITS (HAMAD *et al.*, 2015; JIRKU *et al.*, 2015). Estes estudos reportam dados preliminares e sugerem que a análise de fezes pode ser uma alternativa para vigilância e monitoramento destes agentes patogênicos causadores de zoonoses. Nas fezes de *Gorilla gorilla gorilla* também foi detectado o DNA de cinetoplastídeos monoxênicos ou de vida livre, tais como *Bodo caudatus*, *Parabodo nitrophilus*,

Neobodo designis, *Bodo* sp., *Herpetomonas* sp. e *Phytomonas* sp. (VOTÝPA *et al.*, 2018). Isolados de *Bodo* sp. têm sido obtidos também de fezes de porco, de solo, de coleções hídricas e de outros ambientes incomuns, como em pano de prato e em urina de cachorro (CHAVATTE *et al.*, 2014; CHAVATTE *et al.*, 2016; VANDERSEA *et al.*, 2015).

Neste trabalho, mostramos que a combinação de métodos clássicos de isolamento, aliados à caracterização morfológica e ultraestrutural e a métodos moleculares, é a quimera ideal para o estudo de diversidade eucariótica no microbioma intestinal de PNHs. Atualmente, nossa compreensão de que a microbiota eucariótica e procariótica faz parte da constituição dos organismos multicelulares, como humanos e primatas, tem mudado a forma de analisar e pensar o papel da microbiota. O chamado conceito “holobionte” preconiza que a microbiota tem papel crucial na fisiologia e até mesmo na evolução humana (KUNDU *et al.*, 2017), e pode ser um fator decisivo para o surgimento de diversas doenças, incluindo câncer (VALLIANOU & TZORTZATOU-STATHOPOULOU, 2019). Portanto, estudos que consigam associar informações de sequências de DNA eucariótico, com isolados em cultura são cruciais para compreensão da diversidade eucariótica e das interações que podem ocorrer no complexo micro e macro-ambiente intestinal.

VII. CONCLUSÃO

- Os procedimentos operacionais padrões (POPs) produzidos servirão como uma ferramenta fundamental na promoção da garantia da qualidade da COLPROT em consonância com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, WFCC, OECD;

- O Fluxograma de trabalho elaborado otimizou e simplificou o fluxo de atividades para autenticidade das amostras depositadas;

- Os primatas não-humanos podem ser um modelo ideal não só para os estudos de doenças infecto-parasitária que acometem o ser humano, mas também para melhor conhecermos a microbiota do aparelho digestório.

- Utilizando as fezes dos primatas não-humanos, foi possível isolar e caracterizar dois protozoários de vida livre (*Bodo* sp. e *Cholamonas* sp.), sendo que o terceiro isolado não foi identificado por apresentar 94% de identidade com vários protozoários da ordem Cercomonadida.

- O uso de diferentes técnicas de caracterização morfológica, ultraestrutural e molecular permitem uma identificação mais precisa de novos isolados, servindo de suporte para o estudo da biodiversidade de microrganismos, sejam eles parasitos ou de vida livre.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, **NBR**, ISO, 9001 (2015) Sistema de Gestão da Qualidade - Requisitos.

ABNT, **NBR**, ISO/IEC 17025 (2017) Norma Brasileira - Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. 3ª edição. p: 1-31

ABREU MMVD, TUTUNJI VL (2008) Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde** 2: 236-251.

ANDRADE M (2002) Principais doenças de primatas não-humanos in: Andrade A, Pinto S, Oliveura R (eds) Animais de Laboratório: criação e experimentação **FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, p. 388.

ARANDA, A.T. (2014) Coleções Biológicas: Conceitos básicos, curadoria e gestão, interface com a biodiversidade e saúde pública. **III Simpósio sobre a biodiversidade da Mata Atlântica**, p. 45-56.

ATTIAS M, VOMMARO RC, de SOUZA W (1996) Computer aided three-dimensional reconstruction of the free-living protozoan *Bodo* sp. (Kinetoplastida: Bodonidae). **Cell structure and function** 21: 297-306.

BORGHESAN TC, FERREIRA RC, TAKATA CSA, CAMPANER M, BORDA CC, PAIVA F, MILDER RV, TEXEIRA MMG, CAMARGO EP (2013) Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies. **Annals of Anatomy** 164: 129-152.

CAMARGO EP (1964) Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 6: 93-100.

CANHOS DAL, SOUSA-BAENA MS, de SOUZA S, MAIA LC, STEHMANN JR, CANHOS VP, de GIOVANNI R, BONACELLI MBM, LOS W, TOWNSEND PETERSON A (2015) The importance of biodiversity e-infrastructures for megadiverse countries. **PLoS Biology** 13: 1-7.

CANHOS V, VAZOLLER R (2005) Coleções de culturas de serviços e centros de recursos biológicos. **Nota técnica**.

CANHOS VP (2003) Para biodiversidade: padrões, protocolos e ferramentas. **Ciência e Cultura [online]** 55: 45-47.

CANHOS D. A. L., SOUZA S., CANHOS V. P. (2006) Coleções biológicas e sistemas de informação **Centro de Referência em Informação Ambiental –(Cria)** p. 1-43.

CARVALHO ALM (1973) Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). **VeT. Pat. Trop.** 2: 223-274.

CATTA-PRETA CMC, dos SANTOS PASCOALINO B, de SOUZA W, MOTTRAM JC, MOTTA MCM, SCHENCKMAN S (2016) Reduction of Tubulin Expression in *Angomonas deanei* by RNAi Modifies the Ultrastructure of the Trypanosomatid Protozoan and Impairs Division of Its Endosymbiotic Bacterium. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 63: 794-803.

CAVALIER-SMITH T (1998) A revised six-kingdom system of life. **Biol. Rev. Camb. Philos Soc.** 73: 203-266.

CAVALIER-SMITH T (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification on protozoa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 52: 297-354.

CHAVATTE N, BARE J, LAMBRECHT E, VAN DAMME I, VAEREWIJCK M, SABBE K, HOUF K (2014) Co-occurrence of free-living protozoa and foodborne pathogens on dishcloths: implications for food safety. **Int. J. Food Microbiol.** 191: 89-96.

CHAVATTE N, LAMBRECHT E, VAN DAMME I, SABBE K, HOULF K (2016) Abundance, diversity and community composition of free-living protozoa on vegetable sprouts. **Food Microbiology** 55: 55-63.

COIMBRA-FILHO A., MAIA AA (1974) Contribuição ao manejo racional da colônia de "rhesus" (*Macaca mulatta*) na ilha do Pinheiro, GB, Brasil – (Cercopithecidae – Primates). **Brasil Florestal** 5: 13-25.

d'AVILA-LEVY CM, BOUCINHA C, KOSTYGOV A, SANTOS HLC, MORELLI KA, GRYBCHUK-IEREMENKO A, DUVAL L, VOTÝPKA J, YURCHENKO V, GRELLIER P, LUKES J (2015) Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** 110: 956-965.

d'AVILA-LEVY CM, YURCHENKO V, VOTÝPKA J, GRELLIER P (2016) Protist Collections: Essential for Future Research. **Trends in Parasitology** 32: 840-842.

de SOUZA W (2008) Electron microscopy of trypanosomes-a historical view. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** 103: 313-325.

DEMARAY SY, ALTMAN NH, FERRELL TL (1978) Suspected ascorbic acid deficiency in a colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Lab. Anim. Sci.** 28: 457-460.

DESCHAMPS P, LARA E, MARANDE W, EKELUND F, MOREIRA D (2011) Phylogenomic Analysis of Kinetoplastids Supports That Trypanosomatids Arose from within Bodonids. **Molecular Biology and Evolution** 28: 53-58.

DIEULIIS D, JOHNSON KR, MORSE SS, SCHINDEL DE (2016) Opinion: Specimen collections should have a much bigger role in infectious disease research and response. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 113: 4-7.

EVANS VJ, BRYANT JC, KERR HA, SCHILLING EL (1964) Chemically Defined Media for Cultivation of Long-Term Cell Strains from Four Mammalian Species. **Exp. Cell Res.** 36: 439-474.

FLAVIN M, O'KELLY CJ, NERAD TA, WILKINSON G (2000) *Cholamonas cyrtodiopsis* gen. n., sp. n. (Cercomonadida), an Endocommensal, Mycophagous Heterotrophic Flagellate with a Doubled Kinetid **Acta Protozool** 39: 51-60.

FREIRE P (2011) **Pedagogia da autonomia: Saberes necessários à prática educativa.** São Paulo. 54p. Editora: Paz e Terra.

FRIDMAN EP (1972) Recent developments of biomedical research in nonhuman primates. With a short historical review. **Journal of Medical Primatology** 1: 220-229.

FRAGA HC, FUKUTANI KF, CELES FS, BARRAL AM, OLIVEIRA CI (2012) Evaluation of the implementation of a quality system in a basic research laboratory: viability and impacts. **Einstein** (São Paulo) 10(4):491-7.

GALVÃO LM, CANÇADO JR, REZENDE DF (1989) Hemocultures from chronic chagasic patients using EDTA or heparin as anticoagulants. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 22: 841-843.

GLASER K, KUPPARDT A, KROHN S, HEIDTMANN A, HARMS H, CHATZINOTAS A (2014) Primer pairs for the specific environmental detection and T-RFLP analysis of the ubiquitous flagellate taxa Chrysophyceae and Kinetoplastea. **Journal of Microbiological Methods** 100: 8-16.

GONZALEZ M (2010) Análise das restrições de acesso a dados de espécies ameaçadas, previstas em políticas de coleções biológicas científicas brasileiras, à luz do direito ambiental e da ciência da informação. **Ciência Rural** 39: 33-50.

GROSSMAN L, BOCK C, SCHWEIKERT M, BOENIGK J (2016) Small but Manifold - Hidden Diversity in "*Spumella-like* Flagellates". **The Journal of eukaryotic microbiology** 63: 419-439.

GROVES C (2001) Primate Taxonomy 1st ed. **Smithsonian Books.**

GURR E (1965) The rational use of dyes in biology. **Leonard Hill, London.**

HAMAD I, FORESTIER CL, PEETERS M, DELAPORTE E, RAOULT D, BITTAR F (2015) Wild Gorillas as a Potential Reservoir of *Leishmania major*. **J. Infect. Dis.** 211: 267–273.

HANDELSMAN J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 68(4):669-685.

HARMER, J., YIURCHENKO, V., NENAROKOVA, A., LUKES, J., GINGER, M. L. (2018) Farming, slaving and enslavement: histories of endosymbioses during kinetoplastid evolution. **Parasitology** 145, 1311-1323.

HAUSMANN K, HULSMANN N, RADEK R (2003) **Protistology**, Ed.3 ed. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

HOLSBACK L, CARDOSO MJL, FAGNANI R, PATELLI THC (2013) Natural infection by endoparasites among free-living wild animals. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 22: 302-306.

HONINGBERG BM (1963) Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **J. Protozool.** 10: 20-63.

INMETRO (2015) Relatório de Gestão do Exercício de 2015. **Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.**

ISHEMGULOVA A, BUTENKO A, KORTISOVA L, BOUCINHA C, GRYBCHUK-IEREMENKO A, MORELLI KA, TESAROVA M, KRAEVA N, GRYBCHUK D, PANEK T, FLEGONTOV P, LUKES J, VOTÝPKA J, PAVAN MG, OPPERDOES FR, SPODAREVA V, d'AVILA-LEVY CM, KOSTYGOV AY, YURCHENKO V (2017) Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. **PLoS One** 12: e0174165.

JACKSON AP, QUAIL MA, BERRIMAM M (2008) Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: *Bodo saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa). **BMC Genomics** 9: 594.

JENSEN, R.E. & ENGLUND, P.T. (2012) Network news: the replication of kientoplast DNA. **Annus Rev. Microbiol.** 66: 473-491.

JIRKU M, VOTÝPKA J, PETRZELKOVA KJ, JIRKU-POMAJBIKOVA K, KRIEGOVA E, VODICKA R, LANKERSTER F, LEENDERTZ SA, WITTING RM, BOESCH C, MODRY D, AYALA FJ, LEENDERTZ FHe, F. H., LUKES J (2015) Wild chimpanzees are infected by *Trypanosoma brucei*. **Int. J. Parasitol. Parasites and Wildlife** 4: 277-282.

KAPLAN JN (1977) Breeding and rearing squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in captivity. **Lab. Anim. Sci.** 27: 557-567.

KAUP FJ & SCHWIBBE M (2002) Primates as experimental animals. **Dtsch Tierarztl Wochenschr** 109(3):104-108.

KOID A, NESON WC, MRAZ A, HEIDELBERG KB (2012) Comparative analysis of eukaryotic marine microbial assemblages from 18S rRNA gene and gene transcript clone libraries by using different methods of extraction. **Applied and Environmental Microbiology** 78: 3958-3965.

KUNDU P, BLACHER E, ELINAV E, PETTERSON S (2017) Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. **Cell** 171: 1481-1493.

LIMA OA, SOARES J, GRECO JB, GALIZII, CANÇADO JR (1992) **Métodos de laboratório aplicados à clínica** 21-9 a 21-12.

LOYOLA-MACHADO AC, AZEVEDO-MARTINS AC, CATTAPRETA CMC, de SOUZA W, GALINA A, MOTTA MCM (2017) The Symbiotic Bacterium Fuels the Energy Metabolism of the Host Trypanosomatid *Strigomonas culicis*. **Protist** 168: 253-269.

LUKES J, SKALICKÝ T, TÝC J, VOTÝPKA J, YURCHENKO V (2014) Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology** 195: 115-122.

MAKIUCHI T, ANNOURA T, HASHIMOTO T, MURATA E, AOKI T, NARA T (2008) Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: An extraordinary gap between Kinetoplastids and Diplonemids. **Protist** v. 159 (3) 459-470.

MANFIO G (2003) Avaliação do Estado do Conhecimento da Diversidade Biológica do Brasil Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. **Ministério do Meio Ambiente**, Secretaria de Biodiversidade e Florestas.

MARKMANN M, TAUTZ D (2005) Reverse taxonomy: An approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 360: 1917-1924.

MEDLIN L, KOOISTRA WHCF, SCHMID AMM (2000) A review of the evolution of the diatoms - a total approach using molecules, morphology and geology, in: [eds.] AWJS (ed) The origin and early evolution of the diatoms: fossil, molecular and biogeographical approaches. **Polish Academy of Sciences, Krakow, Poland.**

MARANDINO M, RODRIGUES J, SOUZA MP (2014) Coleções como estratégia didática para a formação de professores na pedagogia e na licenciatura de Ciências Biológicas. **Apresentação de trabalho no V Enebio/ II Erebio**, SP, p. 1- 12, 2014.

MITTERMEIER R, KONSTANT W, MAST R (1994) Use of neotropical and Malagasy primate species in biomedical research. **American Journal of Primatology** 34: 73-80.

MOREIRA D, LOPEZ-GARCIA P, VICKERMAN K (2004) An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 1861-1875.

MOTTA MC, SOARES MJ, ATTIAS M, MORGADO J, LEMOS AP, SAAD-NEHME J, MEYER-FERNANDES JR, De SOUZA W (1997) Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. **Eur. J. Cell. Biol.** 72: 370-377.

MYL'NIKOV AP, KARPOV SA (2004) Review of diversity and taxonomy of cercomonads. **Protistology** 3: 201-217.

NERAD TA, DAGGETT PM (1992) Cryopreservation of diplomonads other than *Giardia*, in: Soldo EJJLaAT (ed) *Protocols in Protozoology*. Society of Protozoologists. **Allen Press, Lawrence, Kansas**, pp. A70.71-70.72.

NEVES D, LANE DE MELO A, LINARDI P, VITOR R (2011) *Parasitologia Humana*. **Editora: Atheneu Rio**.

NOWAK RM (1999) **Walker's Mammals of the World**. Volume 2, 6a ed.

OECD (2007) **Best Practice Guidelines for Biological Resouce Centres**. p:1-113.

OLSEN O (1986) **Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology**. Dover Publications.

PASTEUR L, CHAMBERLAND MM, ROUX ME (1884) Pathologie experimentale sur la rage. **C. R. Hebd Seances. Acad. Sci.** 89: 1229-1235.

PEIXOTO AL, BARBOSA MR, MENEZES M, MAIA LC (2006) Diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. **Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Ministério da Ciência e Tecnologia**: 145-182.

PISSINATTI A (2001) Medicine, selected disorders, in: Cubas Z, Fowler M (eds) *Biology, Medicine and Surgery of the South American Wild Animals*, 1st ed. ed. **Iowa State University Press**, p. 536.

POSADA D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. **Mol. Biol. Evol.** 25: 1253-1256.

REY L (2008) **Bases da Parasitologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

RYLANDS AB (1993) **Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*. Marmosets and Tamarins: Systematics, Behaviour, and Ecology.**

RYLANDS AB, COIMBRA-FILHO AF, MITTERMEIER R (1993) **Systematics, geographic distribution, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae**. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.

RYLANDS AJB, RODRIGUES-LUNA E (2000) An assessment of the diversity of New World primates. **Neotropical primates**, 8: 61-93.

RODRIGUES E., SERRA A. L., PEREIRA F. M., COSTA E., RAMOS S. A., DOMINGUES A., CRUZ A., BEDOLO E. C., ROCHA T. R., PEREIRA R. L. (1999) Coleção de culturas de microorganismos de interesse biotecnológico e didático, pp. 109-114 ... **EccoS Rev. Cient., UNINOVE, São Paulo**: (1): 109-114.

RODRIGUES JC, GODINHO JL, de SOUZA W. (2014) **Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure**. In: **Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma***. ALS Santos et al (eds). Subcellular Biochemistry 74, 1-42. DOI 10.1007/978-94-007-7305-9_1.

SANTIAGO-RODRIGUEZ TM, FORNACIARI G, LUCIANI S, DOWD SE, TORANZOS GA, MAROTA I, CANO RJ (2016) Taxonomic and predicted metabolic profiles of the human gut microbiome in pre-Columbian mummies. **FEMS Microbiol. Ecol.** 92.

SAYÃO L. F., TOUTAIN L. B., ROSA F. G., MARCONDES C.H. & (2009) **Implantação e gestão de repositórios institucionais: políticas, memória, livre acesso e preservação**. Universidade Federal da Bahia (EDUFBA), P.1-365.

SETTE L (2015) Sistemas Integrados, Recursos Humanos e Infra-estrutura para Coleções Biológicas. **Nota técnica**: 1-13.

SILVA M, CUPOLLILLO E, PIRMEZ C (2011) Fiocruz microbial collections: the impact of biodiversity to public health. **WFCC Newsletter** 51: 7-8.

SILVA M, ROMERO SÁ M (2016) Coleções vivas: as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz. **Revista Museologia & Interdisciplinaridade** 5: 157-169.

SIMPSON AGB, STEVENS JR, LUKES J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology** 22: 168-174.

SNOEYENBOS-WEST OL, SALCEDO T, MCMANUS GB, KATZ LA (2002) Insights into the diversity of choreotrich and oligotrich ciliates (Class: Spirotrichea) based on genealogical analyses of multiple loci. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 1901-1913.

SOUZA-JUNIOR JC (2007) **Perfil sanitário de Burgios Ruivos, Alouatta guariba clamitans (Cabrera 1940) (Primates: Atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de Indaial, Santa Catarina – Brasil.**, Dissertação de mestrado. Universidade de Santa Catarina. Florianópolis.

SRISVASTAVA P, PRAJAPATI VK, VANAERSCHOT M, VAN DER AUWERA G, DUJARDIN JC, SUNDAR S (2010) Detection of *Leptomonas* sp. parasites in clinical isolates of Kala-azar patients from India. **Infect. Genet. Evol.** 10: 1145-1150.

STEVENS JR (2008) Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite** 15: 226-232.

STEVENS JR, GIBSON W (1999) The molecular evolution of trypanosomes. **Parasitol Today** 15: 432-437.

STREET SL, KYES RC, GRANT R, FEGURSON B (2007) Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are highly conserved in rhesus (*Macaca mulatta*) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) macaques. **BMC Genomics** 8: 480.

TAMURA K., AND M.NEI 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.** 10:512-526.

TAYLOR AER, BAKER JR (1986) The cultivation of parasites in vitro. **Blackwell Sc. Publ., Oxford & Edinburgh.**

THORN K (2016) A quick guide to light microscopy in cell biology. **Mol. Biol. Cell.** 27: 219-222.

VALLIANOU NG, TZORTZATOOU-STATHOPOULOU F (2019) Microbiota and cancer: an update. **J. Chemother:** 1-5.

VANDERSEA MW, BIRKENHEUER AJ, LITAKER RW, VADEN SL, RENSCHLER JS, GOOKIN JL (2015) Identification of *Parabodo caudatus* (class Kinetoplastea) in urine voided from a dog with hematuria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 27: 117-120.

VICKERMAN K (1976) The diversity of the kinetoplastid flagellates in: Lumdsen WHR, & Evans DA (eds) Biology of kinetoplastida. **Academic Press, New York,** vol.1, pp. 1-134.

VICKERMAN K (1977) DNA throughout the single mitochondrion of a kinetoplastid flagellate: observations of the ultrastructure of *Cryptobia vaginalis* (Hesse, 1910). **J. Protozool.** 24: 221-233.

VICKERMAN K (1978) The free-living trypanoplasms: descriptions of three species of the genus *Procryptobia* n. g., and redescription of *Dimastigella trypaniformis* Sandon, with notes on their relevance to the microscopical diagnosis of disease in man and animals. **Trans. Am. Microsc. Soc.** 97: 485-502.

VICKERMAN K (1991) Organization of the bodonid flagellates, in: Patterson D, J. L (eds) *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. **Clarendon Press, Oxford**, pp. 159-176.

VICKERMAN K (1994) The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int. J. Parasitol.** 24: 1317-1331.

VICKERMAN K, LE RAY D, HOEF-EMDEN K, DE JONCKHEERE J (2002) The soil flagellate *Proleptomonas faecicola*: cell organisation and phylogeny suggest that the only described free-living trypanosomatid is not a kinetoplastid but has cercozoan affinities. **Protist** 153: 9-24.

VON DER HEYDEN S, CHAO EE, VICKERMAN K, CAVALIER-SMITH T (2004) Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonid flagellates and the evolution of euglenozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 51: 402-416.

VOTÝPA J, PAFCO B, MODRÝ D, MBOHLI D, TAGG N, PETRZELKOVÁ KJ (2018) An unexpected diversity of trypanosomatids in fecal samples of great apes. *International Journal for Parasitology*: **Parasites and Wildlife** 7: 322-325.

VOTYPKA J, d'AVILA-LEVY CM, GRELLIER P, MASLOV DA, LUKES J, YURCHENKO V (2015) New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. **Trends Parasitol.** 31: 460-469.

VPPCB (2018) **Vice-presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas da FIOCRUZ - Manual de Organização de Coleções Biológicas da FIOCRUZ - Ministério da Saúde** p.1-17.

WALLACE FG (1966) The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Exp. Parasitol.** 18: 124-193.

WILSON DE, REEDER DM (1993) *Manual Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. **Smithsonian Institution Press.**, Washington, DC.

WFCC (2010) **World Federation for culture collections guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms - 3ª edição** p: 1-19.

ZAHER H, YOUNG PS (2003) As coleções zoológicas brasileiras: panorama e desafios. **Ciência e Cultura** 55: 24-26.

ZICCARDI M, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R (1998) Morphological Features of Trypanosomes from Squirrel Monkeys from the Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93(1):45-55.

ANEXO 1

SEQUÊNCIAS PARCIAIS DOS GENES 18S e gGAPDH de *Bodo* sp. OBTIDAS NESTE ESTUDO

SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 18S de *Bodo* sp OBTIDA NESTE ESTUDO

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp  ATGGCAATGCCTCAGAATAATCGTTTGCGAGAATCTGCGCATGGGCTATTACATCAGACGTAACTGCCGCAATAGCTTTGCGGTCTCCGCATTATTGG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Bodo sp  ATAACTTGCGAAATGTCAAGCTAATACATGAACTAATGCAAACCTCTTCGGAGTTTTGCTGCGAATGAATGAAATTAAACCAATGCCGCGACGCGGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Bodo sp  AGCAACACAGCAGTGTTGACTCAATTCCGTGCGAAGCTGGGTTTACCAGCGTCTTTGACGAACAACTGCCCTATCAGCTTTGTTGCGAGTGTAG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Bodo sp  TGGACTGCCAAGGCTTTGACGGGACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCTGAGAATAGCTACCACTCTACGGAGGGCGAGCGGGCGC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Bodo sp  AAATTGCCCAATGTCAAAAAAACGATGAGGCAGCGAAAAGAATAGGGCCTGCAGACGGTTCTGCCGTATGTGGGATACAATGGGGGATATTTAATGCC
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
Bodo sp  ATCCAAAATCGAGTATCAATTGAGGACAAGTCTGGTCCAGCACCCGGTAATTCCAGCTCCAAAGCGTATTTAACGCTGCTGCTTTAAGGGGTT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
Bodo sp  CGTAGTTGAATTGTGGCTTGCGAATACGCTGTCCTGTCCTCTTGAGGGCACCAGCGCTTGCGCTGAACATTCGAAACACAAAACCACGGGAATGGTT
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
Bodo sp  CCTTCCAATTTCACATGTCATGCATGTGGAAGGCCGCCGTGATTTTACTGTGACTTAAAAAAGCGCGACCAAAGCAGTCGTTCCGACTGAATTTTCAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
Bodo sp  GCATGGGATAACCAAGCTAACCTTCGGATATTTCCGTTTCGGCTTTTGTTGGTTTTAACAGTCCGTAGGACATTATAAGCGAGTGTGACAGCCCTTTCG
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
Bodo sp  GGGGTTCCGGCTGCCGGTTCATTTCGCTTCGAATGAAAGAGGGTTGTCGGGGGGAACCGTACTGAGGCGTGAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCCTTAA
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
Bodo sp  GACGAACTACAGCGAAGGCATTCTCCAGGATACCTTCCAATCAAGAACCAAAGGTGGGAGATCGAAGATGATTAGAGCCATTGTAGTCCACCCAC

```

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp AAACGGTGACACCCATGAATTGGGGATTTTTTGGTCGTTGCGGGTTGGGCTTGCTCAATTGCGAACCAATATTTCAATTTACGTGCACGTTCAACACC

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp CCTCACGGGGATTACGGGAACATCCTCAGCACGTTTTTTATTCTTCACGCCGAAAGCTTTGAGGTTATAGTCTCAGGGGGGAGTACGTTCCGCAAGAGTGA

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp AACTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTCCGGTTTAAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGAGAGGGTGAGGAT

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp TGACAGATTGAGTGTTCCTTCGATCCCTTCAATGGTGGTGCATGGCCGCTTTTGGTCCGGTGGAGTGATTTGTTTGGTTGATTCGGTCAACGGACGAGA

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp TCCAAAGCTGCCAGTAGAAACCAGGATTTCCAAAAGACAGCAATCTTCTGTCTGCTCCGGCAGTCAGGAGTTCCAATCCAGTTGGTTTCTTCTCTGCAG

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp GATTCCTTGTTTTGCACAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCCACTACAATGTCAGTGAGAACA

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp AGATTCCCGTAACAAGGAGTCCCTGCTTGATTCAAAGAGCGGGGAACCAACCGGAATCACAATAGACCCGATTGGGACCGAGGATTGCAATTATTGGTCGCG

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp CAACGAGGAATGTCCTGTAGGCCGAGCTCATCAAACGTGCGGATTACGTCCCTGCCATTTGTACACACCGCCCGTCGTTGTTTCCGATGGATGGCGAAA

1910 1920 1930 1940 1950 1960
|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp TACAGGTTGTTGGACTGGCTTTACCGCCGGGAAGATAACCGATATTTAATCATAGAGGAA

SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE gGAPDH de *Bodo* sp. OBTIDA NESTE ESTUDO

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          CAGTGTGACAAGCTCCTCGTCAGTGTAGCTCAAGAAATTCCTTGAGGTAAAGTCTTAGAGGCATCTTGAGGGCAGCATCGATAGCCTTGATAGAGGTATC
      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          CTTCTTGGTTGTGAAGGTAAAGTTCGACAACTGAGACATCGGGAGTGGGAACGCGGAATGACATACCCGGTGGAGCTTACCTTGGTGGAGGGCAAACCTCG
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          CCGACTGCCTTGGCGGCACCAGTGGARGAAGGAATAATGTTGCAGGCCGCGGCACGTCCACCACGCCAGTCCCTCTGAGAAACACCATCAACAGTCTTCT
      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GGGTAGCGGTGTAGGAGTGAATGGTAGTCATCAAGCCGGTCTCAACTCCGAAGCCCTCCTTCATGAGAACGTGGACGAGAGGAGCGAGGCAGTTCGTGGT
      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GCAAGAAGCATTTGGAACAACTTGTGGGTGGAAGGATTGTACTCCTCGTGGTTAACGCCCATGACGAGGGTCTTCACGCCGCCCTTAGCAGGAGCGGAA
      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          ATAATGACCTTCTTTCGCGCCGGCCTTGATGTGTCCTTCGGCCTTATCCCTTCTCAGTGAAGAGGCCAGTAGACTCAATGACGTAAATCGACGCCAAGCTTGC
      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          CCCAGGGGAGGTTCGGCAGGGCTGCGGGTGGCCTTGATACACTGGATACGGTGTCCGTTGACAACAATGACATCGTTGGACTTAGCGGAGGGGCTGGACTT
Bodo sp  ..
          GG

```

LOCALIZAÇÕES DOS OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES NA SEQUÊNCIA parcial de 18S

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          ATGGCAAATGCTCAGAACTAACTGCTTTGCAGGAATCTGCGCATGGCTCATTACAATCAGACGFAATCTGCCGAAATAGCTTTGCGGTCCTCCGCATTATTGG
          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          ATAACTTGGCGAAATGTCAAGCTAATACATGAACCTAAATGCAAACCTCTTCGGAGTTTTGCTGCGAATGAATGAAATTAATAACAATGCCGCGGACGCGGC
          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          AGCAACACAGCAGTGTGACTCAATTCATTCCGTGCGAAAGCTGGTTTACCAGCGTCTTTTGACGAACAACCTGCCCTATCAGCTTGTGTTGGCAGTGTAG
          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          TGGACTGCCAAGGCTTTGACGGGAGCGGGGATAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGCTACCACCTTCTACGGAGGGCAGCAGGCGCGC
          410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          AAATTGCCCAATGTCAAAAAAAAAACGATGAGGCAGCGAAAAGAAATAGGGCCTGCAGACGGTTCTGCCGTATGTGGGATACAATGGGGATATTTAATGCC
          510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          ATCCAAAATCGAGTATCAATTGGAGGACAAGTCTGGTGCCAGCACCCCGGGTAAATCCAGCTCCAAAAGCGTATATTAACGCTGCTGCTTAAGGGTT
          610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          CGTAGTTGAATTGTGGCTTGCGAATACGCTGTCTGTCTCTTTGAGGGCACCAGCGCTTGCTTGCCGTGAACATTGGAACACAAAACACGGGAATGGTT
          710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          CCTTCCAAATTTCAATGTCATGCATGTGGAAGGCGCCCGTGAATTTTACCTGTGACFAAAAAAGCGGACCAAGCAGTTCGACCTGAATTTTCAA
          810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GCATGGGATAACAAGCTAACCTTCGGATATTTCCGTTTTCCGCTTTTGTGGTTTTAACAGTCCGTAGGACATTATAAGCGAGTGTGACAGCCCTTTCG
          910     920     930     940     950     960     970     980     990    1000
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GGGGTTCCGGCTTCCGGTTCAATTCGCTTCAGAAAGAAAGAGGGTTGTCGGGGGAGAACCTACTGAGGCGTGAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCCCTTAA
          1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
Bodo sp  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GACGAACTACAGCGAAGGCAATTCCTCCAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGAGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACCAC

```

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp AAACGGTGACACCCATGAATTGGGGATTTTTTGGTCCGCTTCGCGGTTGGGCTTGCTCAATTGCGAACAACCAATATTTCAATTTACGTGCACGTTCAACACC

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp CCTCACGGGATTAACGGGAACATCCTCAGCACGTTTTTTATTCTTCACGCGAAAGCTTGAGGTTAAGTCTCAGGGGGAGTACGTTGCAAGAGTGA

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp AACTTAAAGAAATTGACGGAATGGCACCACAAGACGTGGAGCGTCCGGTTTAAATTTGACTCAACACGGGGAACTTTACCAGATCCGGAGAGGGTGAGGAT

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp TGACAGATTGAGTGTCTTTCTCGATCCCTTCAATGGTGGTGCATGGCCGTTTTGGTCCGGTGGAGTGATTTGTTGGTTGATTCCGTCAACGGACGAGA

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp TCCAAGCTGCCAGTAGAAACCAGGATTTCCAAAAGACAGCAATCTTCTGTCTGCTTCGGCAGTCAGGAGTCCATCCAGTTGGTTCTTCTCTGCAG

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp GATTCTTTGTTTTGCACAAGGTGAGATTTTGGGCAACAGCAGGTCTGTGATGCTCCCTCAATGTTCTGGGCGACACGCGCACTACAAATGTCAGTGAGAACA

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp AGATTCCCGTAACAAGGAGTCTGCTTGATTCAAAGAGCGGGGAACACCAGGAATCACATAGACCCGATTTGGGACCGAGGATTGCAATTATTGGTCCGG

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp CAACGAGGAAATGCTCGTAGGCGCAGCTCATCAAACGTGCCGATTACGTCCCTGCCATTTGTACACACCGCCCGTCGTTGTTTCCGATGGATGGCGAAA

1910 1920 1930 1940 1950 1960
|.....|.....|.....|.....|.....|
Bodo sp TACAGGTTGTTGGACTGGCTTTACCGCCGGGAAGATAACCGATATTTAATCATAGAGGAA

Oligonucleotídeo Iniciador V7/V8

Oligonucleotídeo iniciador Kineto_80/Kineto_651

Oligonucleotídeos iniciadores direto Kineto14F e EUKA estão localizados a montante de 10 bp e 40 bp e os iniciadores reversos Kineto2026R e EUKB estão a 30 bp jusante da sequência consenso obtida neste estudo.

ANEXO 2

SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE SSU-rDNA *Cholamonas* sp OBTIDAS NESTE ESTUDO

SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 18S de *Cholamonas* sp OBTIDA NESTE ESTUDO

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cholamonas sp ATTCAATCGGTAGCAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAATCAATGCACGCTGATGACGTGCGTTTACTAGGAATTCCTCGTTCAAGACC
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cholamonas sp AATAATTGCAATGGTCTATCCCCAGCAGATTTGTTTCGAGATTTCCCTCCGTCCCAGAGATACGTGGCACTCGAAGAGATTCACTAATACTTG
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cholamonas sp CGGACAAATCAGTGTAGCGCGCGTCGGGCCCAGAACATCTAAGGGCATCACGGACCTGTTATTGCTTTGAACTTCCACCGGTACGACGCCGATAGTCT
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cholamonas sp TGCTAAGAGAACAATACACTTGCATACACAAGGCAGTCTATTACAACCAAGTCTCGTTCGTTACCGGAATTAACCAGACAAATCACTCCACCAC
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cholamonas sp TAAGAACGGCCATGCACCACCCATAGAATCAAGAAAAATCGTCAATTTGTCAATCCTCACTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTTCCCGTGTTGAGTCA
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Cholamonas sp AATTAAGCCCAGGGTCCACTCCTGGTGGTGCCTTCCGTCAATTCCTTAAGTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCCGGACCTGAAGACTCTGGTT
Cholamonas sp .
Cholamonas sp T

```

ANEXO 3

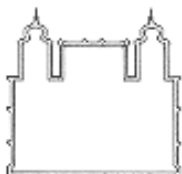
SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE 18S ISOLADO AG137-2 OBTIDA NESTE ESTUDO

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  ATCTATACTGTGAACTGCGAATGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTCTTTGCTACTTGGATAACCGTAGTAATTCAGAGCTAATACAT
      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  GCGTCAATACTACTCTTCGGAGTGGTTGTATTTATTAGATGGAACTGATGCGGGCTTGCCCGGTAATTGGTGATTCCATAATAACTTTCGGATCGACACT
      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  CGTTTGTGCATGCATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCACCATTGGCATTAAACGGGTAACGGAGAATTAGGGTTCGA
      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  TTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCCGCTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAA
      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  CAATGCTAGGCTTTTAAAGTCCGGCGATTGGAAATGAGAACAATTTAAATACCTATACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGT
      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  AATCCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGGTCTCGGATATTGACCCATCTCGAATGAGATGCGAT
      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  AGTCATAGTATCTGAGGCCATCCTCGGGGAAAACAAGTCGGCCATTTACTTGGTTCGGTTTGGGGTCTCTCGTCAATTTACTGTGAGCAAAATAGAGTGTTT
      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  AAAGCAGGCTTTATGCCGTTGAATACATTAGCATGGAATAATAAGATAAGACCCTGGTCTAAATTTTGGTGTACTCCAAGGTAATAAATTAATAGGGA
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  CAGTTGGGGTATTTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTTATGGAAGACGAACACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATC
      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AG137-2  AAGAACGAAAGTTAGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAACTATGCCGACTAGGGATTGGTGGATGTTTGTAAAGACTCCAT

```


ANEXO 4
PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÕES



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 107	CÓDIGO POP-COLPROT-001
--	---------------	---------------	---------------------------

TÍTULO

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Procedimento*
7. *Referências Bibliográficas*
8. *Histórico da última revisão*

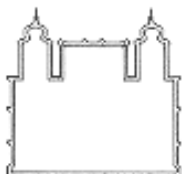
1. OBJETIVO

Conjuntos de regras e operações bem definidas e não ambíguas, aplicadas para o direcionar que tipos de metodologias serão utilizadas na identificação das amostras a serem depositadas na COLPROT.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA
-----------	------------	----------	------



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

108

CÓDIGO

POP-COLPROT-001

TÍTULO

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

3. DEFINIÇÕES

Não aplicável.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. PROCEDIMENTO:

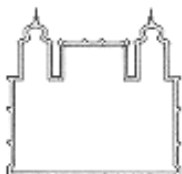
- O isolado deverá ser depositado com um código de entrada no livro-tombo da coleção de protozoários, as informações essenciais a constar no registro são: 1) data da coleta, 2) identificação do hospedeiro ou material de isolamento; 3) responsável pela identificação do hospedeiro, coleta, isolamento e depósito; 4) responsável pelo depósito e data de entrada.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 109	CÓDIGO POP-COLPROT-001
--	---------------	---------------	---------------------------

TÍTULO

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

- Em seguida, no laboratório, o isolado deverá ser em 24 horas, semeado no meio de cultura apropriado (LIT ou NNN/LIT), armazenado na BOD à 28 °C;

- Fazer um esfregaço (lâmina-tipo) para ser observado após a coloração por Giemsa, no microscópio óptico com a objetiva de 100X (óleo de imersão);

- A amostra deverá ser contada na câmara de Neubauer (POP-016), para ter um Pellet de 10^7 parasitos;

- O Pellet deverá ser lavado 2 x em PBS (pH 7,2) e centrifugado à 850 x g por 10 min e congelado no freezer a -20 °C para posterior extração de DNA (POP-19);

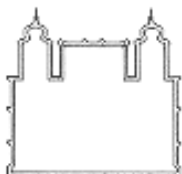
- Na criopreservação, a ordem Trypanosomatida, isto é, para a maioria dos cinetoplastídeos, a solução crioprotetora utilizada será o glicerol a 10%. Já os protozoários pertencentes a ordem Cercomonadida, ou protozoários de vida livre como por exemplo, *Bodo* ou *Euglena* costumam ser criopreservados com o metanol 3 ou 5%. A solução crioprotetora DMSO servirá como terceira opção para a criopreservação;

- Na figura 1, se o isolado tiver taxonomia preliminar ou definida deverá seguir a abordagem de análise padrão;

- Em contrapartida, se o isolado que estiver com a taxonomia incerta deverá seguir a abordagem polifásica;

- Na figura 2, segue o delineamento do trabalho empregado para a padronização do isolado que foi depositado na coleção de protozoários.

ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA
-----------	------------	----------	------



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO
00

PÁGINA
110

CÓDIGO
POP-COLPROT-001

TÍTULO

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

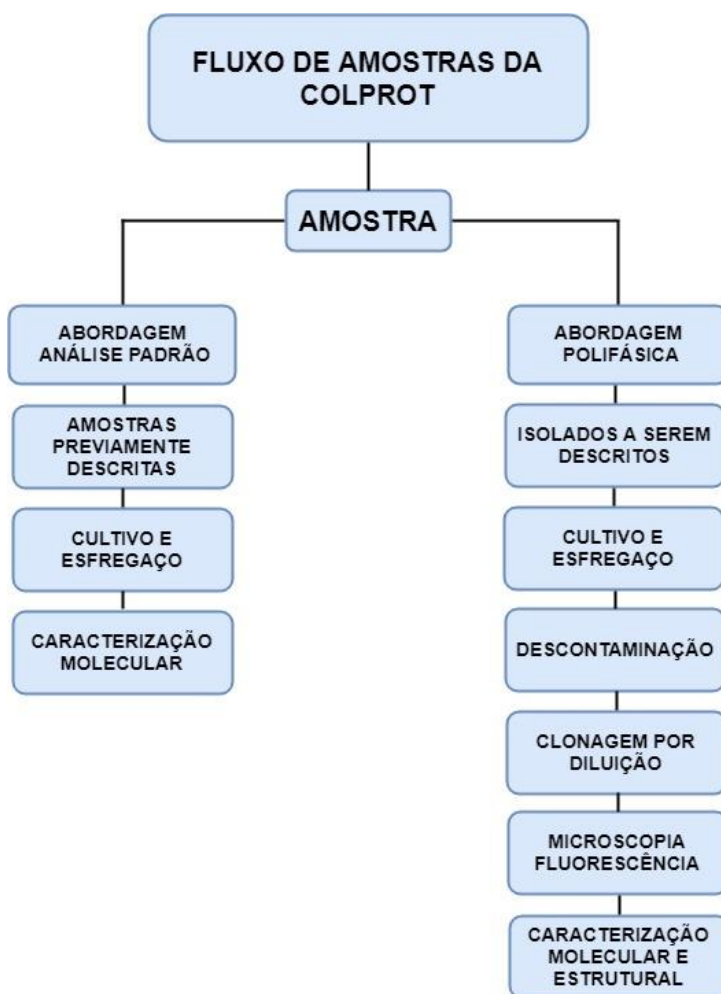


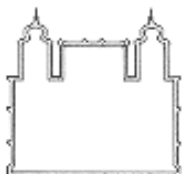
Figura 1: Fluxograma de trabalho operacional para o aprimoramento da qualidade.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 111	CÓDIGO POP-COLPROT-001
--	---------------	---------------	---------------------------

TÍTULO

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

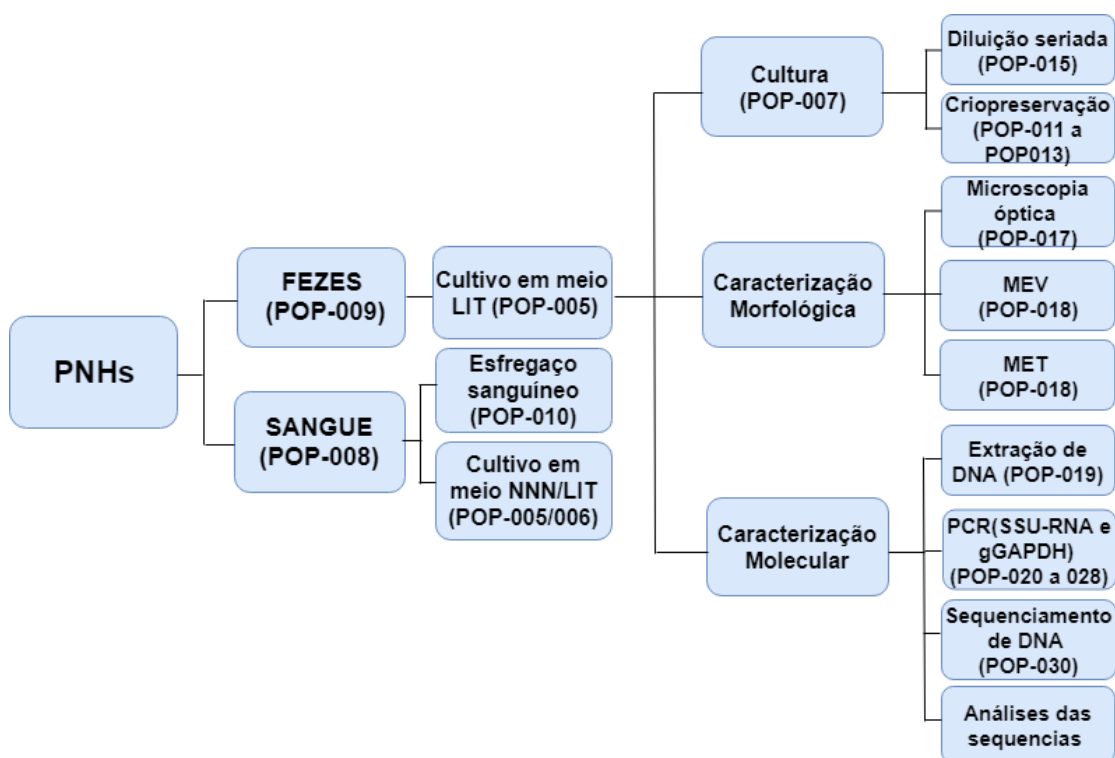
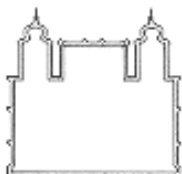


Figura 2: Delineamento do trabalho empregado para a padronização do fluxo de trabalho na COLPROT.

ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA
-----------	------------	----------	------



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	REVISÃO 00	PÁGINA 112	CÓDIGO POP-COLPROT-001
--	---------------	---------------	---------------------------

TÍTULO

FLUXOGRAMA DE TRABALHO DA COLPROT PARA DEPÓSITO DE MATERIAL

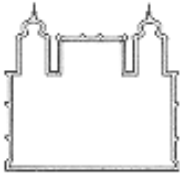
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SETTE L (2015) Sistemas Integrados, Recursos Humanos e Infra-estrutura para Coleções Biológicas. Nota técnica: 1-13.
- SILVA M, ROMERO SÁ M (2016) Coleções vivas: as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz. Revista Museologia & Interdisciplinaridade 5: 157-169.

8. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Primeira edição do documento

ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA
-----------	------------	----------	------



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

113

CÓDIGO

POP-COLPROT-002

TÍTULO

INATIVAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO

INATIVAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO

SUMÁRIO

- 1 *Objetivo*
- 2 *Campo de Aplicação*
- 3 *Definições*
- 4 *Siglas*
- 5 *Responsabilidades*
- 6 *Material*
- 7 *Procedimento*
- 8 *Referências Bibliográficas*
- 9 *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Inativar o soro fetal bovino para ser utilizado no meio de cultura.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

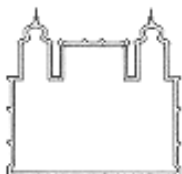
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

114

CÓDIGO

POP-COLPROT-002

TÍTULO

INATIVAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

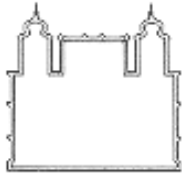
- Banho Maria a 56 °C
- Um frasco com 500 mL de soro fetal bovino
- Cabine de segurança biológica
- Tubos estéreis do tipo falcon15 mL
- Pipetas sorológicas estéreis
- Etiquetas

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

115

CÓDIGO

POP-COLPROT-002

TÍTULO

INATIVAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO

7. PROCEDIMENTO:

- O banho Maria deverá estar a 56 °C.
- O líquido do soro deverá ser aquecido no banho Maria a 56 °C durante 30 min para inativar proteínas do sistema complemento.
- Após a inativação, o soro deverá ser aliqotado, na cabine de segurança biológica, em tubos estéreis de 15 mL e etiquetado (etiqueta padrão) contendo o nome do soro, data de distribuição, lote, a data da validade e o responsável pela a distribuição.
- Uma pequena alíquota do soro fetal bovino deverá ser separada para o teste de esterilidade e incubado a 37 °C em BOD por 7 dias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves E. e Guimarães R. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Capítulo 5 Cultivo celular. Pág. 248 EPSJV, IOC, 2012.
- Rizzo E. et al, 1984. Study on the growth promoting capacity of calf and fetalbovine sérum for animal cells “*in vitro*” Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 26(2):97-104.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

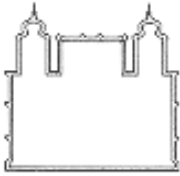
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

116

CÓDIGO

POP-COLPROT-003

TÍTULO

MENSURAÇÃO DO PH COM PHMETRO

MENSURAÇÃO DO PH COM PHMETRO

SUMÁRIO

- 1 *Objetivo*
- 2 *Campo de Aplicação*
- 3 *Definições*
- 4 *Siglas*
- 5 *Responsabilidades*
- 6 *Material*
- 7 *Procedimento*
- 8 *Referências Bibliográficas*
- 9 *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

O pHmetro é um equipamento utilizado para medir e verificar o pH de meios de cultura, soluções, entre outros.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

4. DEFINIÇÕES

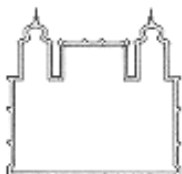
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

117

CÓDIGO

POP-COLPROT-003

TÍTULO

MENSURAÇÃO DO PH COM PHMETRO

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- PHmetro (marca: BEL engineering, modeloW3B)

- Soluções tampão:

✓ 4,0 (solução ácida);

✓ 7,0 (solução neutra);

✓ 10,0 (solução básica);

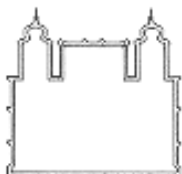
- Solução salina saturada

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

118

CÓDIGO

POP-COLPROT-003

TÍTULO

MENSURAÇÃO DO PH COM PHMETRO

7. PROCEDIMENTO:

Calibração:

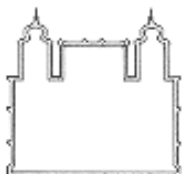
- Ligar o equipamento na tomada elétrica de 220 Volts;
- Pressionar o botão IN/OF localizado no painel do equipamento para ligar o equipamento e verifique se acenderá esta opção na parte superior do display e o valor 7,0 referente ao pH do primeiro tampão;
 - Remover a tampa de proteção da extremidade inferior do eletrodo, seguida da remoção da tampa de proteção de borracha localizada na parte superior do eletrodo;
 - Lavar o eletrodo com água destilada e secar suavemente com o papel seda;
 - Colocar o eletrodo no tampão de calibração pH 7,0 e agite três vezes suavemente;
 - Pressionar (ENTER) para confirmar a calibração. Quando o valor se estabilizar, o display piscará três vezes e a medida do pH será indicada;
 - Lavar o eletrodo com água destilada e seque suavemente;
 - Colocar o eletrodo no tampão pH 4,0;
 - Pressionar (ENTER) para o reconhecimento automático do tampão. Quando o valor se estabilizar, o display piscará três e a medida do pH estará indicada;
 - Lavar o eletrodo com água destilada e secar suavemente;
 - Colocar o eletrodo no tampão pH 10,0;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

119

CÓDIGO

POP-COLPROT-003

TÍTULO

MENSURAÇÃO DO PH COM PHMETRO

- Pressionar (ENTER) para o reconhecimento automático do tampão. Quando o valor se estabilizar, o display piscará três e a medida do pH será indicada;

- Ao final da calibração, o pHmetro irá exibir o delta do eletrodo e retornar ao modo da leitura.

- Após a calibração, enxaguar novamente a ponteira do eletrodo com água destilada e secar com o papel seda;

Atenção: Por causa do reconhecimento automático do tampão, instrumento poderá exibir uma mensagem "ERR" quando o eletrodo for removido do tampão pH 7,0 para a lavagem antes da sua colocação no tampão pH 4,0. Isto **não é um erro**, e o instrumento irá retornar ao estado normal quando o eletrodo for colocado no tampão pH 4,0.

Mensuração do pH:

- Imergir o eletrodo dentro da solução a ser mensurada, mexer suavemente e aguardar até o display estabilizar;

- Após mensurar, enxaguar o eletrodo com água destilada e colocar a tampa de borracha e a tampa de proteção. A tampa de borracha deve estar sempre completa com solução saturada;

OBSERVAÇÕES:

- Mensurar o pH impreterivelmente antes de sua utilização;

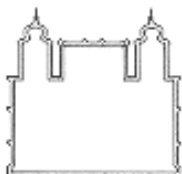
- Valores fora do padrão deverão ser comunicados de imediato;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

120

CÓDIGO

POP-COLPROT-003

TÍTULO

MENSURAÇÃO DO PH COM PHMETRO

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Buck Pr., Rondinini S., Covington KA., Baucke GKF., Brett MAC., Camões MF., Milton JTM. Mussini T., Nauman R., Pratt WK., Spitzer P., Wilson SG. Measurement of pH definition, standards and procedures. International Union of Pure and applied Chemistry. © IUPAC Recommendations (serial online) 2002; 74(11):2169-2200.

- Manual pHmetro serie: K39-0014P – KASVI (<http://kasvi.com.br/como-medir-ph/>).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

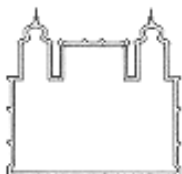
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

121

CÓDIGO

POP-COLPROT-004

TÍTULO

SOLUÇÕES DE HCl e NaOH

SOLUÇÕES DE HCl e NaOH

SUMÁRIO

- 1 *Objetivo*
- 2 *Campo de Aplicação*
- 3 *Definições*
- 4 *Siglas*
- 5 *Responsabilidades*
- 6 *Material*
- 7 *Fórmula*
- 8 *Procedimento*
- 9 *Referências Bibliográficas*
- 10 *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Preparar soluções para tentar manter o pH do meio de cultura dentro de uma faixa ideal de neutralidade.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

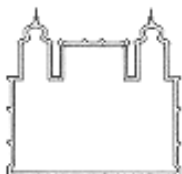
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

122

CÓDIGO

POP-COLPROT-004

TÍTULO

SOLUÇÕES DE HCl e NaOH

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

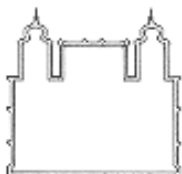
- Balança analítica;
- Beckers de 100 mL;
- Garrafas de vidro de 100 mL com tampa rosca;
- Funil;
- Provetas volumétricas;
- Placas de Petri;
- Espátulas;
- Água destilada ou purificada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

123

CÓDIGO

POP-COLPROT-004

TÍTULO

SOLUÇÕES DE HCl e NaOH

7. FÓRMULA

- HCl 6N

PRODUTOS QUÍMICOS	VOLUME
HCl 6N	49,78 mL
H ₂ O q.s.p. 100 mL	

- NaOH 1N

PRODUTOS QUÍMICOS	VOLUME
NaOH 1N	4 g
H ₂ O q.s.p. 100 mL	

8. PROCEDIMENTO:

Preparação do HCl 6N:

1 – O HCl deverá ser manipulado dentro da capela de exaustão, por ser uma solução aquosa queimante. É um ácido inorgânico forte, que exala vapores altamente irritantes para os olhos e nariz, por isso deve ser manuseado com devidas precauções, uso de EPI;

2 - Uma proveta de vidro em 100 mL;

3 - Colocar primeiramente a água destilada (50,22 mL);

4 - Adicionar o ácido clorídrico (49,78 mL de HCl), devagar e com cuidado;

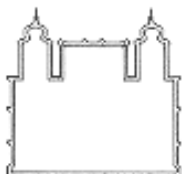
5 - A adição do HCl na água destilada iniciará uma reação exotérmica, onde a proveta vai esquentar consideravelmente, portanto, a adição deve ser lenta;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

124

CÓDIGO

POP-COLPROT-004

TÍTULO

SOLUÇÕES DE HCl e NaOH

6 - Após o seu esfriamento, armazenar essa solução em uma garrafa âmbar já etiquetada contendo o nome da solução química, a data de fabricação e a data da validade;

Preparação do NaOH 1N:

1 - O NaOH é uma base química que é também conhecida como soda cáustica. É altamente corrosivo. O NaOH 1N aumenta o pH;

2 - Ligar a balança (marca: Shimadze, modelo: BL320H);

3 - Pesar 4 g de NaOH;

4 – Colocar as 4 g de NaOH no Becker de vidro de 100 mL;

5 - Acrescentar 90 mL de água destilada;

6 - Em seguida homogeneizar bem a solução;

7 - Esta solução deverá ser avolumada para 100 mL numa proveta de 100 mL;

8 - E em seguida, armazenar em uma garrafa âmbar já etiquetada contendo o nome da solução química, a data de fabricação e a data da validade;

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Goldani E., Boni L. A. B., Santos A. M. (2009). Manual para o preparo de reagentes e soluções. Grupo Tchê Química.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

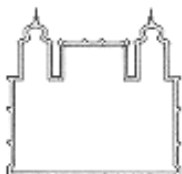
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

125

CÓDIGO

POP-COLPROT-005

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER INFUSION-TRYPTOSE)

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER-INFUSION-TRYPTOSE)

SUMÁRIO

- 1 *Objetivo*
- 2 *Campo de Aplicação*
- 3 *Definições*
- 4 *Siglas*
- 5 *Responsabilidades*
- 6 *Material*
- 7 *Fórmula*
- 8 *Procedimento*
- 9 *Referências Bibliográficas*
- 10 *Histórico da última revisão*

1.OBJETIVO

Preparar o meio de cultivo LIT para a manutenção e isolamento de protozoários flagelados na coleção de Protozoários da FIOCRUZ (COLPROT).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

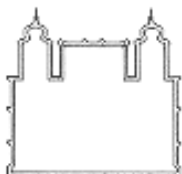
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

126

CÓDIGO

POP-COLPROT-005

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER INFUSION-TRYPTOSE)

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DATT	Departamento de Apoio Técnico e Plataforma Tecnológica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
KCl	Cloreto de Potássio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

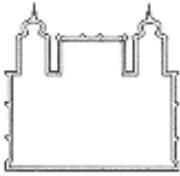
- Balança analítica;
- Placas de Petri;
- Espátulas;
- Água destilada ou purificada;
- Beckers de 1 litro;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

127

CÓDIGO

POP-COLPROT-005

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER INFUSION-TRYPTOSE)

- Garrafas de vidro de 1 litro com tampa rosca;
- Funil;
- Papel xarope;
- Provetas volumétricas;
- PHmetro;

7. FÓRMULA

- Meio LIT

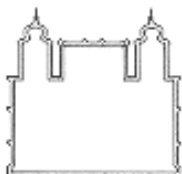
PRODUTOS QUÍMICOS	CONCENTRAÇÃO	PESO/VOLUME
<i>Liver Infusion</i>	-----	5 g
<i>Tryptose</i>	----	5 g
NaCl	68,4 mM	4 g
KCl	5,36 mM	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	30,0 mM	4,26 g
Glicose (D+) (anidra)	11,1 mM	2 g
Hemina (0,01g/mL em NaOH 1N) (*)	15,3 mM	1 mL
H ₂ O q.s.p.900 mL		

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

128

CÓDIGO

POP-COLPROT-005

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER INFUSION-TRYPTOSE)

8. PROCEDIMENTO:

Preparo do meio LIT:

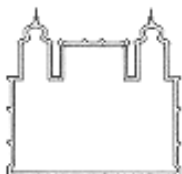
- 1 - Ligar a balança (marca: Shimadze, modelo: BL320H);
- 2 - Pesar os seguintes componentes: 5 g de tryptose; 5 g de liver infusion;
4 g de NaCl; 0,4 g KCl; 4,26 g de Na₂HPO₄; 2 g de glicose (D+) (anidra);
- 3 - Estes produtos químicos são colocados no becker de 1 L com 600 mL de água destilada;
- 4 - Homogeneizar bem e antes de completar o seu volume final de 900 mL, medir o pH. Que deverá estar em torno de 7,2.
- 5 – Caso o pH do meio de cultivo, não estiver em 7,2 utilizar as soluções HCl 6N ou NaOH 1N (POP-004);
- 6 - Em seguida, coar o meio pelo menos duas vezes em papel xarope (obrigatório) para retirar substrato mais grosseiro. Depois, colocar o meio de cultivo na garrafa de tampa rosca;
- 7 - Autoclavar o meio de cultivo, por 20 a 25 minutos a 120 °C;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

129

CÓDIGO

POP-COLPROT-005

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER INFUSION-TRYPTOSE)

Preparo da solução de Hemina

Solução de Hemina: é necessário pesar 10 mg de Hemina em uma placa de vidro para relógio circular onde se adiciona 1 mL de NaOH 1N (dissolver bem a Hemina).

Na cabine segurança biológica acrescentar no meio LIT

- Para amostras em processo de axenização utiliza-se pepiraciclina Pepiracilina/Tazobactam (2,2 mg/5 mL);
- Para a manutenção das culturas axênicas adicionar a penicilina G (100 UI/mL) e o soro fetal bovino;
- O soro deve ser preferencialmente de bezerro ou fetal bovino e inativado a 56 °C.

OBS: A esterilização do meio de cultivo é realizada pelo DATT no pavilhão Artur Neiva.

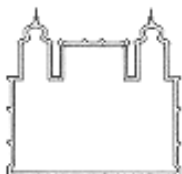
O fornecedor do produto químico não é especificado, portanto não há impacto na sua reprodutibilidade.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

130

CÓDIGO

POP-COLPROT-005

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – LIT (LIVER INFUSION-TRYPTOSE)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomemes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 93-100.
- Castellani, O., Ribeiro, L.V. & Fernandes, J. F. (1967). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Protozool.*, 14: 447-451.
- Camargo. E. P. (1997). Enzimas do ciclo da ornitina-arginina em tripanosomatídeos significado fisiológico e valor taxômico. Tese de Livre Docência (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo).
- Chiari, E. & Camargo, E. P. (1984). Culturing and cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: C. M. Morel (ed.), *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

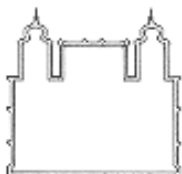
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

131

CÓDIGO

POP-COLPROT-006

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – N.N.N. (Novy, MacNeal, Nicolle)

MEIO DE CULTIVO - NNN (Novy, MacNeal, Nicolle)

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Fórmula*
7. *Material*
8. *Procedimento*
9. *Referências Bibliográficas*
10. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Preparar o meio de cultura NNN para a manutenção, isolamento e depósito de isolados na coleção de Protozoários da FIOCRUZ (COLPROT).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento se aplica a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

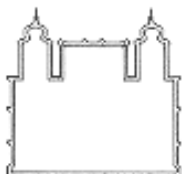
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

132

CÓDIGO

POP-COLPROT-006

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – N.N.N. (Novy, MacNeal, Nicolle)

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
NaCl	Cloreto de sódio
NNN	Meio de cultivo Neal, Novy, Nicolle
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a técnica de acordo com este POP.

6. MATERIAL

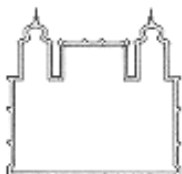
- Balança analítica;
- Erlenmeyer de 200 mL;
- Água destilada;
- Espátulas;
- Papel de alumínio;
- Cabine de segurança biológica;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

133

CÓDIGO

POP-COLPROT-006

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – N.N.N. (Novy, MacNeal, Nicolle)

7. FÓRMULA

PRODUTOS QUÍMICOS	CONCENTRAÇÃO	PESO
Bacto Agar	-----	3,0 g
NaCl	5,12 mM	1,5 g
H ₂ O q.s.p. 200 mL		

8. PROCEDIMENTO

8.1 – Obtenção do sangue de carneiro desfibrinado, estéril:

- O sangue de carneiro é obtido pelo ICTB (Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos) – FIOCRUZ;

8.2 – Base - ágar:

1 - Ligar a balança (marca: Shimadze, modelo: BL320H);

2 - Pesar 3 g de bacto - ágar; 1,5 g de NaCl no Erlenmeyer;

3- Estes produtos químicos deverão ser colocados diretamente no erlenmeyer contendo 200 mL de água destilada;

4 - O ágar é dissolvido facilmente a altas temperaturas, por isso a solução não homogênea deverá ser encaminhada diretamente para esterilização a 120 °C durante 20 min, onde também ocorrerá a homogeneização do ágar.

OBSERVAÇÃO: A esterilização desta base é realizada pelo DATT no pavilhão Artur Neiva, 2° andar, sala 11.

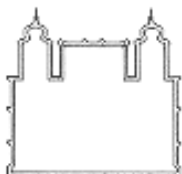
O produto químico não é especificado, portanto não há impacto na sua reprodutibilidade.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

134

CÓDIGO

POP-COLPROT-006

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – N.N.N. (Novy, MacNeal, Nicolle)

8.3 - Base de ágar-sangue:

1 – Na cabine de segurança biológica, para cada base de ágar, acrescentar 10% a 30% de sangue de carneiro desfibrinado em relação ao volume total da base de ágar.

2 – A base de ágar deve estar com a temperatura entre 40 – 60 °C para preservar as características do sangue.

3 - Distribuir cerca de 4 mL em tubos de ensaio 16x150 mm, ou 3 mL nos tubos de falcon estéril (15 mL), os quais devem ficar ligeiramente inclinados (5°) até endurecimento do ágar.

4 - Antes de utilizar os tubos, testar quanto à esterilidade (37 °C, 24h à 48h).

- Acrescentar no NNN o meio de cultivo LIT (POP-005).

- Rendimento: cerca de 60 tubos.

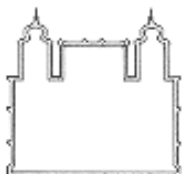
NOTA: Este meio foi inicialmente elaborado por Novy & MacNeal (1903, 1904) e subsequentemente modificado por Nicolle (1908), e é conhecido pela sigla NNN.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

135

CÓDIGO

POP-COLPROT-006

TÍTULO

MEIO DE CULTIVO – N.N.N. (Novy, MacNeal, Nicolle)

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Taylor, A.E.R. & Baker, J.R. (1968). *The cultivation of parasites "in vitro"*. Blackwell Sc.Publ., Oxford & Edinburgh.
- Shaw, J.J. & Lainson, R. (1981). The in vitro cultivation of members of the *Leishmania braziliensis complex*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75-127.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

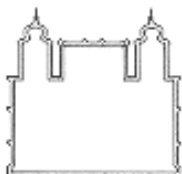
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

136

CÓDIGO

POP-COLPROT-007

TÍTULO

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Fórmula*
7. *Material*
8. *Procedimento*
9. *Referências Bibliográficas*
10. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Descrever procedimentos de manejo de culturas contaminadas com fungos e/ou bactérias para obtenção de cultura pura.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento se aplica a materiais biológicos

3. DEFINIÇÕES

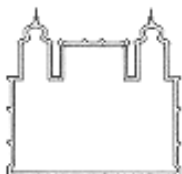
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

137

CÓDIGO

POP-COLPROT-007

TÍTULO

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a técnica de acordo com este POP.

6. MATERIAL

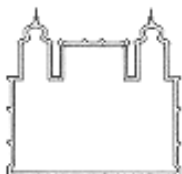
- Balança analítica;
- Espátulas;
- Placas de Petri;
- Água destilada;
- Capela de fluxo laminar;
- Tubos estéreis;
- Membrana estéril 0,22 µm;
- Tubo W;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

138

CÓDIGO

POP-COLPROT-007

TÍTULO

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

- Meio LIT;
- Soro Fetal Bovino (SFB);
- Pipetas sorológicas;
- Cultura em exponencial;
- Cabine de segurança biológica;

7. FÓRMULA

PRODUTOS QUÍMICOS	GRAMAS
Pepiracilina sódica/Tazobactam sódico 4 g + 500 mg	4 g + 500 mg
H ₂ O q.s.p. 30 mL	

8. PROCEDIMENTO

8.1 – Deverá diluir a solução do antibiótico Pepiracilina sódica/Tazobactam sódico em 10 mL de PBS e esterilizar pelo filtro de membrana estéril 0,22 µm na cabine de segurança biológica;

Tendo uma concentração de 2,2 mg/50µL.

8.2 – No meio LIT (POP-005) acrescentar 100 µL de Pepiracilina (2,2 mg/50µL), adicionar também 10% de SFB no volume total de 5 mL de LIT.

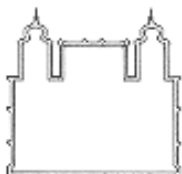
8.3 - Após uma breve observação da cultura, coletar meio de cultura contendo parasitos (500 µL) e adicioná-los no novo meio de cultivo, com o antibiótico.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

139

CÓDIGO

POP-COLPROT-007

TÍTULO

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

OBSERVAÇÃO: A nova cultura será observada e repicada a cada 48-48 horas ou em 72-72 horas. À medida que minimizar as bactérias, será necessário a diminuição da dosagem do antibiótico até a sua axenização.

8.4 - Método de descontaminação por bactérias: Podemos optar por uma centrifugação de uma cultura por 10 min a 850 x g. Nesse processo as bactérias que são mais leves ficam no sobrenadante e os parasitos que são mais pesados formam um pellet. Lavar o pellet 2 a 3 vezes com PBS estéril. Em seguida utilizar o pellet para o repique em um novo meio de cultura na cabine de segurança biológica.

8.5 – Método de descontaminação por fungos:

Podemos optar por uma centrifugação de uma cultura por 15 min a 850 x g. Depois colocar esse tubo na estufa de B.O.D. a 28 °C por 30 min a 1 hora. Nesse processo os fungos que são mais pesados ficam no fundo formando um pellet, os parasitos migram para a interface entre o meio líquido e o ar em função do seu metabolismo oxidativo e capacidade de locomoção pelo flagelo. Em seguida, na cabine de segurança biológica, coletar 200 µL ou 300 µL da região mais superior do meio e realizar o o repique em um novo meio de cultura.

8.6 – Processo de descontaminação de fungos por tubo W:

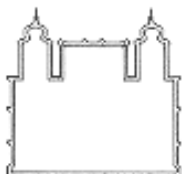
Uma cultura em fase exponencial será necessária. Na cabine de segurança biológica, colocar o tubo W, meio LIT, SFB, pipetas sorológicas e deixar na UV por 20 minutos. No tubo W, em uma extremidade, colocar 10

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

140

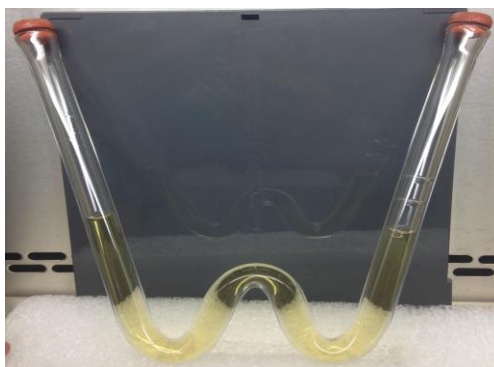
CÓDIGO

POP-COLPROT-007

TÍTULO

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

mL de LIT com 10% de SFB. Em outra extremidade do tubo W é colocado a cultura. Em seguida, vedar as extremidades com parafilme e colocar na estufa de BOD a 28 °C. Após dois dias, observar se há presença de isolados e coletar 500 µL da cultura na extremidade oposta da inoculação, com redução da contaminação fúngica.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rex, J.H.; Pfaller, M.A.; Walsh, T.J.; Chaturvedi, V.; Espinel-ingroff, A.; Ghannoum, M.A.; *et al.* Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 14, p.643-658, 2001.

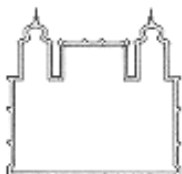
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomemes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 93-100.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

141

CÓDIGO

POP-COLPROT-007

TÍTULO

DESCONTAMINAÇÃO DOS ISOLADOS NO MEIO DE CULTURA

- Souza, J.H. (2010). Susceptibilidade Antifúngica de cepas de *Candida albicans* Isoladas de Pacientes Hospitalizados. Anais do XIX EAIC - Guarapuava –PR.

- Romero A., Solé-Cava, Sousa M.A., Souza W., Attias M. 2000. Ultrastructural and biochemical characterization of promastigote and cystic forms of *Leptomonas wallacei* n. sp. Isolated from the intestine of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). J. Euk. Microbiol 47: 208-220.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

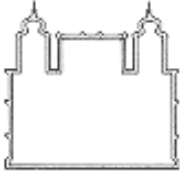
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

142

CÓDIGO

POP-COLPROT-008

TÍTULO

ISOLAMENTO DE HEMOPROTOZOÁRIO

ISOLAMENTO DE HEMOPROTOZOÁRIO

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Procedimento*
7. *Referências Bibliográficas*
8. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Estabelecer um protocolo padrão para isolar protozoários a partir de sangue venoso.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

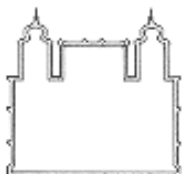
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

143

CÓDIGO

POP-COLPROT-008

TÍTULO

ISOLAMENTO DE HEMOPROTOZOÁRIO

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. PROCEDIMENTO

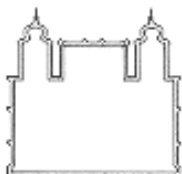
- Fazer o meio de cultivo LIT (POP- 005).
- Fazer o meio de cultivo NNN (POP- 006).
- Na cabine de segurança biológica asséptica e estéril, colocar pipetas estéreis e tubos com o meio de cultivo NNN;
 - Colocar 3 mL do meio de cultivo LIT com 20% de soro fetal bovino nos tubos NNN.
 - Adicionar neste meio bifásico, cerca de 0,5 mL do sangue venoso do animal.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

144

CÓDIGO

POP-COLPROT-008

TÍTULO

ISOLAMENTO DE HEMOPROTOZOÁRIO

- Através de uma alíquota (20 uL) entre lâmina e lamínula, observar o cultivo no microscópio óptico.
- Os tubos deverão ser mantidos na estufa de B.O.D. a 28 °C e observados durante seis meses.
- Se a cultura positivar dar andamento no processo de descontaminação (POP-007).
- Descartar a cultura negativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Galvão L.M, Cançado J.R., Rezende D.F., et al. Hemocultures from chronic chagasic patients using EDTA or heparin as anticoagulants. Braz. J. Med. Biol. Res. 1989; 22: 841-843.
- Chiari E., Dias J.C.P., Lana M., et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. Rev, Inst. Med. Trop. S. Paulo 1989; 22:19-23.

8. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

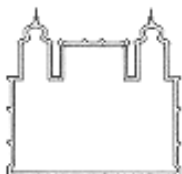
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

145

CÓDIGO

POP-COLPROT-009

TÍTULO

ISOLAMENTO DE PROTOZOÁRIOS DE MATERIAL FECAL

ISOLAMENTO DE PROTOZOARIOS DE MATERIAL FECAL

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Fórmula*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Estabelecer um protocolo padrão para isolar protozoários a partir de material fecal.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento se aplica a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

Não aplicável

4. SIGLAS

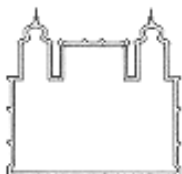
São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

146

CÓDIGO

POP-COLPROT-009

TÍTULO

ISOLAMENTO DE PROTOZOÁRIOS DE MATERIAL FECAL

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
LIT	Liver Infusion Tryptose (meio de cultura)
PBS	Tampão Fosfato Salina
POP	Procedimento Operacional Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2 Técnicos

Executar a técnica de acordo com este POP.

6. MATERIAL

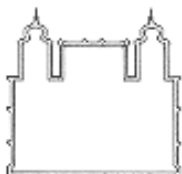
- Capela de fluxo laminar;
- Estufa BOD (28 °C);
- Microscópio óptico, lâminas e lamínulas;
- PBS para diluir as fezes;
- Meio de cultivo LIT com 10% de SFB (POP-005);
- Antibiótico pepiraciclina (POP-007);
- Ependorffs de 5 mL ou tubos de ensaios estéreis;
- PBS;
- Pipetas sorológicas;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

147

CÓDIGO

POP-COLPROT-009

TÍTULO

ISOLAMENTO DE PROTOZOÁRIOS DE MATERIAL FECAL

7. PROCEDIMENTO:

1 - Após coletar as amostras, diluir 2 g de material fecal em 10 mL de PBS;

2- Colocar uma pequena alíquota (entre lâmina e lamínula) para ser observado no microscópio óptico. Caso a amostra estiver positiva, coletar 50 µL e semear no eppendorff.

3 – Cada eppendorff terá: 3 mL meio de cultivo LIT (POP-005) com 10% de SFB, 100 µL de antibiótico pepiraciclina (POP-007).

4 – Preparar um esfregaço fino para coloração em Giemsa tamponado (lâmina-tipo) (POP-010).

5 - Em seguida, as amostras serão colocadas na estufa BOD a 28 °C.

6 – Na capela de fluxo laminar asséptica e estéril, retirar uma alíquota e observar no microscópio óptico.

7 - Deverão ser observadas diariamente ou em 48-48 horas.

8 - As amostras positivas deverão ser repicadas na capela de fluxo laminar em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio LIT com 10% de SFB, 100 µL de antibiótico pepiraciclina (2,2 mg/50µL) e aplicados os procedimentos para obtenção de cultura pura descritas no protocolo POP-007.

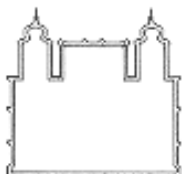
8 – Após da axenização, as amostras deverão ser criopreservadas com soluções crioprotetores e mantidas no nitrogênio líquido (POP-011, POP-012 e POP-013).

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

148

CÓDIGO

POP-COLPROT-009

TÍTULO

ISOLAMENTO DE PROTOZOÁRIOS DE MATERIAL FECAL

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- De Carli, G. A. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- Neves. David Pereira. *Parasitologia Humana*. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
- Espinheiro, R. de F.; Moraes, P. H. G.; Silva, F. D. F. da; Gonçalves, E. C.; Albuguerque, N. I. de; Bomfim, S. R. M.; Dias, H. L. T. Isolamento de *Escherichia coli* do trato gastrointestinal e fezes de caimitus (*Pecari tajacu*) criados em cativeiro. In: International Conference on Wild Life Management in Amazonia and Latin America, 11., 2014, St. Augustine, Trinidad and Tobago. *Alternative Sustainable Conservation & Utilization Methods for Neo-tropical Animals: livro de resumos*. St. Augustine: UWI, 2014. p. 103-104.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

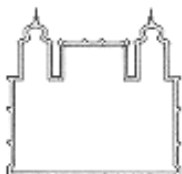
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

149

CÓDIGO

POP-COLPROT-010

TÍTULO

GIEMSA TAMPONADO

GIEMSA TAMPONADO

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Fórmula*
7. *Material*
8. *Procedimento*
9. *Referências Bibliográficas*
10. *Histórico da última revisão*

1.OBJETIVO

Preparar as células dos protozoários para observação ao microscópio óptico através de contraste por corante Giemsa.

2.CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento se aplica a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

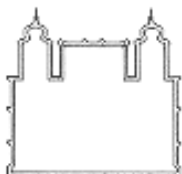
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

150

CÓDIGO

POP-COLPROT-010

TÍTULO

GIEMSA TAMPONADO

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido Clorídrico
Na H ₂ PO ₄ H ₂ O	Fosfato de sódio monobásico
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	Fosfato de sódio dibásico
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2 Técnicos

Executar a técnica de acordo com este POP.

6. MATERIAL:

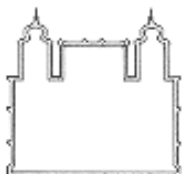
- Balança analítica;
- Placas de Petri;
- Espátulas;
- Água destilada ou purificada;
- Beckers e provetas de 500 mL e de 1 litro;
- Garrafas de vidro de 500 mL e de 1 litro com tampa rosca;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

151

CÓDIGO

POP-COLPROT-010

TÍTULO

GIEMSA TAMPONADO

7. FÓRMULA

- Pesar estes componentes químicos:

PRODUTOS QUÍMICOS	
(solução A) $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ a 0,2 M	8,2794 g
Água destilada	q.s.p. 300 mL

PRODUTOS QUÍMICOS	
(solução B) $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 0,2 M	71,628 g
Água destilada	q.s.p. 1.000 mL

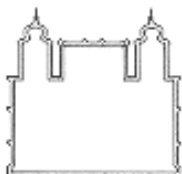
PRODUTOS QUÍMICOS	500 mL
Água destilada	290,13 mL
HCl 5N	209,87 mL

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

152

CÓDIGO

POP-COLPROT-010

TÍTULO

GIEMSA TAMPONADO

8. PROCEDIMENTO:

8.1 - Preparação do tampão fosfatado:

- 1 - Ligar a balança;
- 2 - Pesar as quantidades e preparar a solução A e reservar;
- 3 - Pesar as quantidades e preparar a solução B e reservar;
- 5 - Preparar a solução estoque utilizando 28 partes ou 280 mL da solução A e 72 partes ou 720 mL da solução B;
- 6 - Misturar bem as duas soluções. Esta é a solução estoque;
- 7 - Solução diluída: Numa proveta de 500 mL colocar a solução estoque (50 mL) e acrescentar 450 mL de água destilada (1:10);

8.2 – Esfregaço de lâminas:

– Lâminas Novas:

- 1 - Para desengordurar e limpar as lâminas novas é necessário num recipiente uma mistura de álcool puro com éter numa proporção 1:1;
- 2 - Após 15 min, retirá-las e secá-las com gaze;
- 3 - Em seguida, na lâmina desengordurada, identificar o material, colocar cerca de 20 µL do material biológico e espalhar bem com a ponta da ponteira inclinada;

8.3 - Coloração das lâminas:

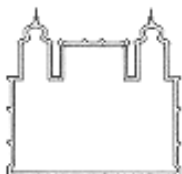
- 1 - Fixar lâminas com metanol absoluto 5-10 min;
- 2 - Escorrer o fixador e deixar secar à temperatura ambiente;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

153

CÓDIGO

POP-COLPROT-010

TÍTULO

GIEMSA TAMPONADO

3 - Cobrir com o HCl 5N e deixar por 10 min. Lavar muito bem em água corrente;

4 - Fazer uma solução de 1:100 com o Giemsa tamponado (1 mL de solução do corante Giemsa + 99 mL do tampão fosfatado diluído);

5 - Corar as lâminas durante 20 - 30 min;

6 - Lavar as lâminas rapidamente sob fluxo delicado de água corrente e deixar secar;

7- Observar as lâminas no microscópio óptico;

NOTA: A solução HCl 5N é opcional, é usada para retirar todas as impurezas do isolado;

OBSERVAÇÃO:

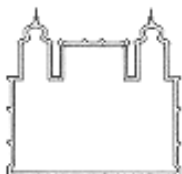
- O tempo de coloração pode variar de acordo com a espécie de parasita, assim como o tempo de fixação em metanol pode variar de acordo com as características de cada isolado. A concentração do corante também vai variar em função do fabricante e meia vida do Giemsa utilizado, os fabricantes já testados pela COPROT e com resultados satisfatórios foram da Merck e da Sigma. Após uma primeira observação baseada no protocolo padrão descrito acima, pode-se diluir mais o corante ou concentrá-lo. Portanto, recomenda-se o preparo de pelo menos cinco lâminas para realizar testes de variação de concentração da solução de Giemsa. O tempo de exposição ao corante também pode ser variado.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

154

CÓDIGO

POP-COLPROT-010

TÍTULO

GIEMSA TAMPONADO

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvalho ALM 1973. Estudos sobre a posição sistemática, a biologia e a transmissão de tripanosomatídeos encontrados em *Zelus leucogrammus* (Perty, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Ver. Pat. Trop* 2: 223-274.

- Kathy Barcker- “Na Bancada” – Manual de Iniciação Científica em Laboratórios de Pesquisas Biomédicas. 435-436.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

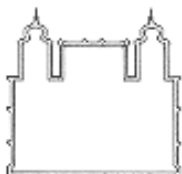
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

155

CÓDIGO

POP-COLPROT-011

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM GLICEROL

CRIOPRESERVAÇÃO COM GLICEROL

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Conservar as células, com glicerol, em temperaturas criogênicas, possibilitando assim a manutenção de sua viabilidade até que seja necessária sua utilização.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

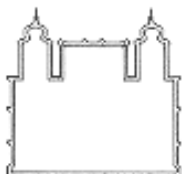
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

156

CÓDIGO

POP-COLPROT-011

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM GLICEROL

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

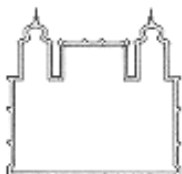
- Cultura de parasitos na fase exponencial;
- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas sorológicas estéreis;
- Tubos de criopreservação estéreis;
- Tubos de ensaio estéreis;
- Glicerol estéril;
- Gelo picado; gelo seco ou congelador a – 70 °C;
- Botijão de nitrogênio líquido;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

157

CÓDIGO

POP-COLPROT-011

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM GLICEROL

7. PROCEDIMENTO

1 - Na cabine de segurança biológica asséptica e estéril, colocar pipetas, tubos de criopreservação, tubos de ensaio, a cultura de protozoários e o glicerol;

2 - Transferir 4 a 5 mL de uma cultura com crescimento em fase log onde estima-se um início 10^6 células para tubo de ensaio estéril, gerando 5 alíquotas. Idealmente 9 mL de cultura para gerar 10 alíquotas de criopreservação;

3 - Acrescentar 10% de glicerol estéril no volume total da cultura e homogeneizar delicadamente;

4 - A solução de criopreservação contendo os parasitos será distribuída cerca de 1 mL nos tubos de criopreservação. Fechar bem e identificar. A partir deste momento, começa o processo de congelamento gradual;

5 - Colocar os criotubos, primeiramente em banho de gelo picado por 30 min;

6 - Em seguida, colocar no freezer durante 1 hora ou até congelar;

7 - Transferir os tubos para um recipiente com gelo seco e deixar por 45 min ou por uma noite, dentro do freezer para garantir que o gelo seco não irá evaporar. Na indisponibilidade de gelo seco, pode deixar em freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h ou durante a noite;

8 - Pôr diretamente no nitrogênio líquido;

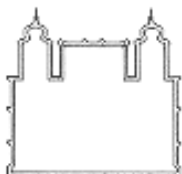
9 - Manter a cultura na estufa através de repiques até a garantia de sucesso da criopreservação.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

158

CÓDIGO

POP-COLPROT-011

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM GLICEROL

OBSERVAÇÃO:

Cada lote de criopreservação deve ser realizado com um mínimo de 5 ampolas e idealmente 10 ampolas, uma ampola será descongelada após permanência no nitrogênio líquido por no mínimo 24 horas e o sucesso da técnica de criopreservação será avaliado.

- Teste de viabilidade:

1- A cada lote de criopreservação, tirar um tubo criogênico do nitrogênio líquido e transferi-lo imediatamente para um banho de gelo até o seu descongelamento.

2 - Sendo uma cultura, semeá-la em meio bifásico (POP-006).

3 – Observar a cultura a cada 48 h, caso a cultura não se observe proliferação celular , repetir o procedimento, ou testar outros protocolos de criopreservação (POP-012 e POP-013).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Protocols in Protozoology, Published by the Society of Protozoologists, 1992. Página: 249.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

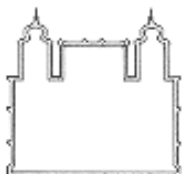
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

159

CÓDIGO

POP-COLPROT-012

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Conservar as células, com DMSO, em temperaturas criogênicas, possibilitando assim a manutenção de sua viabilidade até que seja necessária sua utilização.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

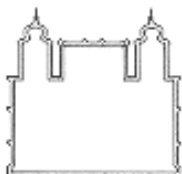
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

160

CÓDIGO

POP-COLPROT-012

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

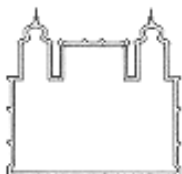
- Cultura de parasitos na fase exponencial;
- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas sorológicas estéreis;
- Tubos de criopreservação estéreis;
- Tubos de ensaio estéreis;
- Dimetil sulfóxido (DMSO) à 99,5%;
- Gelo picado; gelo seco ou congelador a – 70 °C;
- Botijão de nitrogênio líquido;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

161

CÓDIGO

POP-COLPROT-012

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

7. PROCEDIMENTO

1 - Na cabine de segurança biológica asséptica e estéril, colocar pipetas, tubos de criopreservação, tubos de ensaio, a cultura de protozoários e o DMSO;

2 - Transferir 4 a 5 mL de uma cultura com crescimento em fase log onde estima-se um início 10^6 células para tubo de ensaio estéril, gerando 5 alíquotas. Idealmente 9 mL de cultura para gerar 10 alíquotas de criopreservação;

3 - Acrescentar 10% de DMSO estéril (despejar gota por gota) no volume total da cultura e homogeneizar muito delicadamente e bem devagar;

4 – A solução de criopreservação contendo os parasitos será distribuída cerca de 1 mL nos tubos de criopreservação. Fechar bem e identificar. A partir deste momento, começa o processo de congelamento gradual;

5 - Colocar os tubos, primeiramente em banho de gelo picado por 30 minutos;

6 – Em seguida, colocar no freezer durante 1 hora ou até congelar;

7 - Transferir os tubos para um recipiente com gelo seco e deixar por 45 minutos ou por uma noite dentro do freezer. Não havendo gelo seco, pode deixar no congelador – 70 °C por 2 horas ou durante a noite;

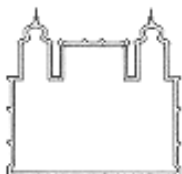
8 - Pôr diretamente no nitrogênio líquido;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

162

CÓDIGO

POP-COLPROT-012

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)

9 – Realizar a manutenção da cultura e mantê-la na estufa até a viabilidade da criopreservação.

OBSERVAÇÃO:

Cada lote de criopreservação deve ser realizado com um mínimo de 5 ampolas e idealmente 10 ampolas, uma ampola será descongelada após permanência no nitrogênio líquido por no mínimo 24 horas e o sucesso da técnica de criopreservação será avaliado.

- Teste de viabilidade:

1- A cada lote de criopreservação, tirar um tubo criogênico do nitrogênio líquido e transferí-lo imediatamente para um banho de gelo até o seu descongelamento.

2 - Sendo uma cultura, semeá-la em meio bifásico (POP-006).

3 – Observar a cultura a cada 48 h, caso não se observe proliferação celular, repetir o procedimento, ou testar outros protocolos de criopreservação (POP-011 e POP-013).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Protocols in Protozoology, Published by the Society of Protozoologists, 1992. Página: 249.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

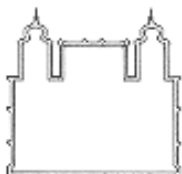
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

163

CÓDIGO

POP-COLPROT-013

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM METANOL

CRIOPRESERVAÇÃO COM METANOL

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Conservar as células, com metanol, em temperaturas criogênicas, possibilitando assim a manutenção de sua viabilidade até que seja necessária sua utilização.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

2. DEFINIÇÕES

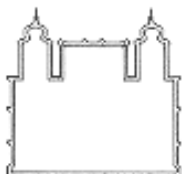
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

164

CÓDIGO

POP-COLPROT-013

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM METANOL

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

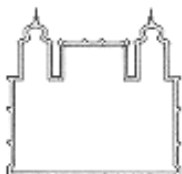
- Cultura de parasitos na fase exponencial;
- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas sorológicas estéreis;
- Tubos de criopreservação estéreis;
- Tubos de ensaio estéreis;
- Álcool metílico absoluto (de preferência frasco que ainda não foi aberto);
- Gelo picado; gelo seco ou congelador a – 70 °C;
- Botijão de nitrogênio líquido;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

165

CÓDIGO

POP-COLPROT-013

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM METANOL

7. PROCEDIMENTO

1 - Na cabine de segurança biológica esterilizada, colocar pipetas, tubos de criopreservação, tubos de ensaio, a cultura de protozoários e o álcool metílico;

2 - Transferir 4 a 5 mL de uma cultura com crescimento em fase log onde estima-se um início 10^6 células para tubo de ensaio estéril, gerando 5 alíquotas. Idealmente 9 mL de cultura para gerar 10 alíquotas de criopreservação;

3 - Acrescentar 3 a 5% de metanol no volume total da cultura e homogeneizar delicadamente (para cada 2 mL de cultura colocar 100 μ L ou 0,1 mL de metanol);

4 – A solução de criopreservação contendo os parasitos será distribuída cerca de 1 mL nos tubos de criopreservação. Fechar bem e identificar. A partir deste momento, começa o processo de congelamento;

5 - Colocar os tubos, primeiramente em banho de gelo picado por 30 min;

6 – Em seguida, colocar no freezer durante 1 hora ou até congelar;

7 - Transferir os tubos para um recipiente com gelo seco e deixar por 45 min ou por uma noite dentro do freezer. Não havendo gelo seco, pode deixar no freezer -70 °C por 2 h ou durante a noite;

8 – Armazenar diretamente no nitrogênio líquido;

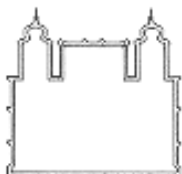
9 – Manter a cultura na estufa através de repiques até a garantia de sucesso da criopreservação.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

166

CÓDIGO

POP-COLPROT-013

TÍTULO

CRIOPRESERVAÇÃO COM METANOL

OBSERVAÇÃO:

Cada lote de criopreservação deve ser realizado com um mínimo de 5 ampolas e idealmente 10 ampolas, uma ampola será descongelada após permanência no nitrogênio líquido por no mínimo 24 h e o sucesso da técnica de criopreservação será avaliado.

- Teste de viabilidade:

1- A cada lote de criopreservação, tirar um tubo criogênico do nitrogênio líquido e transferi-lo imediatamente para um banho de gelo até o seu descongelamento.

2 - Sendo uma cultura, semeá-la em meio bifásico (POP-006).

3 – Observar a cultura a cada 48 h, caso não se observe proliferação celular, repetir o procedimento, ou testar outros protocolos de criopreservação (POP-011 e POP-012).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Protocols in Protozoology, Published by the Society of Protozoologists, 1992. Página: 249.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

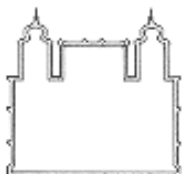
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

167

CÓDIGO

POP-COLPROT-014

TÍTULO

TAMPÃO FOSFATO - SALINO (PBS)

TAMPÃO FOSFATO – SALINO (PBS)

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Fórmula*
8. *Procedimento*
9. *Referências Bibliográficas*
10. *Histórico da última revisão*

1.OBJETIVO

Preparar uma solução tampão em que o seu pH é constante e neutro, por ser uma solução isotônica. Sendo utilizado para diluir os protozoários facilitando assim na contagem.

2.CAMPO DE APLICAÇÃO

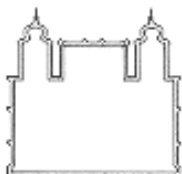
Este documento aplica-se a materiais biológicos.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

168

CÓDIGO

POP-COLPROT-014

TÍTULO

TAMPÃO FOSFATO - SALINO (PBS)

3. DEFINIÇÕES

Não aplicável.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DATT	Departamento de Apoio Técnico e Plataforma Tecnológica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

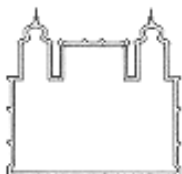
- Balança analítica;
- Espátulas;
- Placas de Petri;
- Um becker e uma proveta de 1 litro;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

169

CÓDIGO

POP-COLPROT-014

TÍTULO

TAMPÃO FOSFATO - SALINO (PBS)

- Garrafa de vidro de 1 litro com tampa rosca;
- Funil;
- Phmetro;

7. FÓRMULA

PRODUTOS QUÍMICOS (PBS-10X)	CONCENTRAÇÃO	PESO
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	104 mM	18,2 g
$\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	18,3 mM	2,2 g
NaCl	1,5 M	87,6 g
H ₂ O q.s.p. 1000 mL		

8. PROCEDIMENTO:

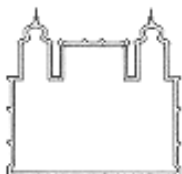
- 1 - Pesar todos esses reagentes na balança analítica;
- 2 - Estes produtos químicos serão colocados no becker com a água destilada.
- 3 - Homogeneizar bem e ajustar o pH para 7,2 usando o pHmetro (POP-003).
- 4- Completar o seu volume total de 1 litro em uma proveta.
- 5- Colocar esta solução, na garrafa de 1 litro com tampa rosca.
- 6– Esterilizar a solução de PBS, por 20 a 25 min a 120 °C.
- 7– Esta é a solução concentrada 10 X.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

170

CÓDIGO

POP-COLPROT-014

TÍTULO

TAMPÃO FOSFATO - SALINO (PBS)

NOTA: A solução tampão, que será utilizada para contagem precisará ser diluída.

Solução diluída: diluir 100 mL de PBS para cada 900 mL de H₂O destilada.

OBSERVAÇÃO: A esterilização desta base é realizada pelo DATT no pavilhão Artur Neiva. O produto químico não é especificado, portanto não há impacto na sua reprodutibilidade.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Portions of this article are from “Phosphate buffered saline. In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved September 17, 2008, from http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline.” This article has been reviewed for scientific accuracy and is used in accordance with Wikipedia’s GNU Free Documentation License (GFDL).

- Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, volume 3, appendix B.12.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

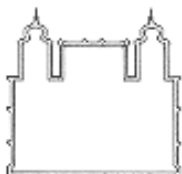
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

171

CÓDIGO

POP-COLPROT-015

TÍTULO

DILUIÇÃO SERIADA DA CULTURA

DILUIÇÃO SERIADA DA CULTURA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1.OBJETIVO

Este POP será utilizado em isolados que possuem populações mistas, que através das diluições seriadas teremos uma única população clonal de protozoários.

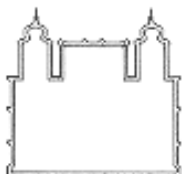
2.CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a materiais biológicos.

3.DEFINIÇÕES

Não aplicável.

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

172

CÓDIGO

POP-COLPROT-015

TÍTULO

DILUIÇÃO SERIADA DA CULTURA

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

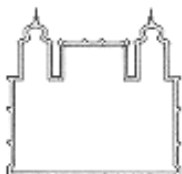
5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Tubos de ensaio estéreis;
- Meio de cultivo LIT (POP-005);
- Soro Fetal Bovino (SFB);
- Cabine de segurança biológica;
- Pipetas sorológicas estéreis;
- Cultura em exponencial;
- Contador de células;
- Câmara de Neubauer;
- Eppendorffs e suporte para eppendorffs;

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

173

CÓDIGO

POP-COLPROT-015

TÍTULO

DILUIÇÃO SERIADA DA CULTURA

- PBS;
- Micropipetas;
- Ponteiras de 200 µL;
- Recipientes para descartar ponteiras e pipetas;

7. PROCEDIMENTO

7.1 - Quantificação da amostra:

1 - Colher uma alíquota do isolado (0,3 mL) da cultura em fase exponencial e colocar no eppendorff.

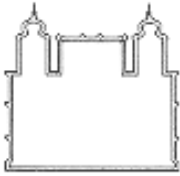
2 - Fazer uma diluição 1:100 (diluir a amostra com PBS) e contar na câmara de Neubauer e determinar o número de parasitas/ mL. A partir do número de parasitos por mL determinado, realizar uma diluição para obter uma densidade celular de 10^5 / mL (POP-016).

7.2 - Diluição seriada:

1 - Após determinar o número de parasitas / mL, na cabine de segurança biológica, a diluição da cultura - mãe será feita na seguinte ordem:

2 – Primeiramente, em um tubo estéril com 900 µL de meio de cultivo adicionar 100 µL da cultura mãe, homogeneizar bem. Com isso, a concentração de parasitos será menor que a amostra original. Obtendo uma diluição 1:10 da amostra original, isto é, de 10^5 / mL para 10^4 / mL no volume total de 1 mL.

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

174

CÓDIGO

POP-COLPROT-015

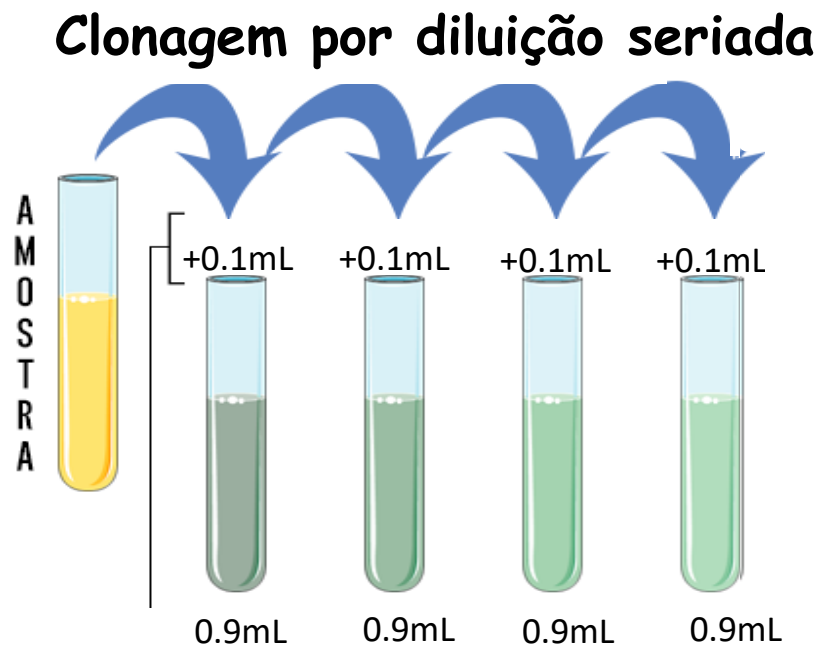
TÍTULO

DILUIÇÃO SERIADA DA CULTURA

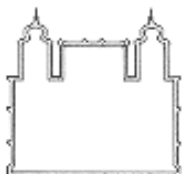
3 – Repetir o procedimento acima, a partir da primeira diluição, obtendo uma diluição 1:100 da amostra original, isto é $10^3/$ mL, repetir este procedimento até a obtenção de $10^1/$ mL.

7- A partir desta diluição, observar o crescimento do isolado.

8 – Temos como exemplo a figura abaixo:



DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

175

CÓDIGO

POP-COLPROT-015

TÍTULO

DILUIÇÃO SERIADA DA CULTURA

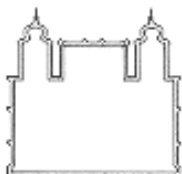
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ciências, F. D. E., Veterinárias, A. E., Em, P. L., & Montassier, H. J. (2016).
Práticas Laboratoriais em Imunologia Básica e Aplicada.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Primeira edição do documento.

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

176

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Determinar a quantidade de células da suspensão preparada no tubo de ensaio para curva de crescimento ou diluição seriada através da contagem ao microscópio.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento se aplica a materiais biológicos.

3. DEFINIÇÕES

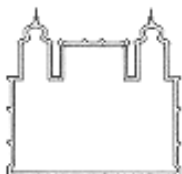
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

177

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2 Técnicos

Executar a técnica de acordo com este POP.

6. MATERIAL:

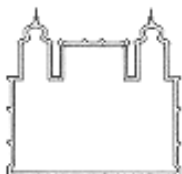
- Câmara de Neubauer e lamínula;
- Microscópio óptico;
- Agitador vortex;
- Tubos de eppendorff;
- Estante para tubos de eppendorff;
- Micropipetas de 100 a 1000 µL;
- Micropipeta de 100 µL para carregar a câmara de Neubauer;
- Ponteiras para as pipetas;
- Piscete com água destilada para as diluições e para limpar a câmara de Neubauer;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

178

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

- Piscete com álcool 70% para limpar a câmara de Neubauer;
- Papel macio para limpar/enxugar a câmara de Neubauer e a lamínula;
- Becker de 250 mL para conter água destilada a ser usada nas diluições;
- Becker de 500 mL para colocar os eppendorf e ponteiros de pipeta usadas;
- Becker de 500 mL para conter o álcool e água utilizados na limpeza da câmara e lamínula de Neubauer;

7. PROCEDIMENTO:

7.1 – Câmara de Neubauer:

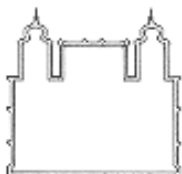
A câmara de Neubauer consiste em uma lâmina de microscopia mais espessa que a normal contendo repartições que ajudarão na contagem e cálculo das células. Deve ser utilizada com a objetiva de 40X no microscópio óptico. Usar lamínulas especiais que fornecem a profundidade correta da câmara de contagem. Não usar lamínulas comuns. É composta por duas câmaras (independentes), uma superior e uma inferior. (Figura 1).

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

179

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

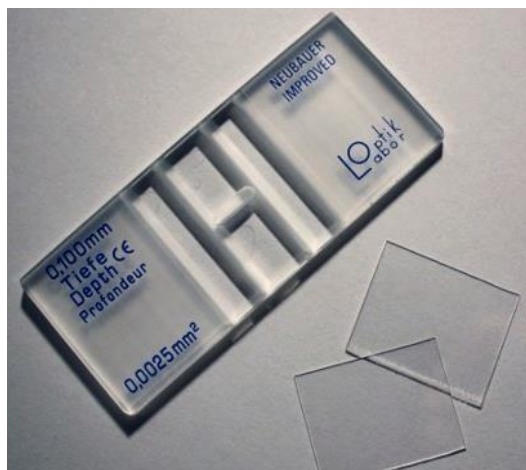


Figura 1: Câmara de Neubauer.

Cada câmara possui uma grade no centro, onde a contagem celular é realizada. A grade possui 4 quadrantes laterais com 16 quadrados menores cada. No quadrante central existem outros 25 quadrados menores com 16 quadradinhos cada. Cada grade de contagem tem 3 mm x 3 mm de tamanho e é subdividida em nove quadrantes de 1 mm x 1mm (Figura 2).

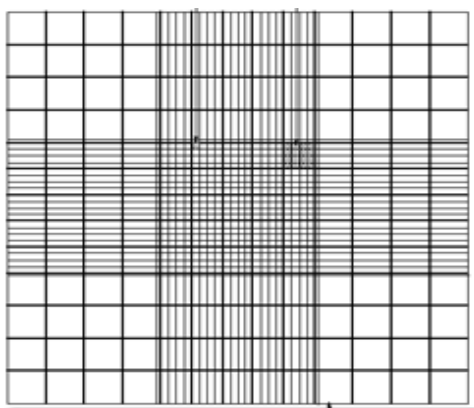


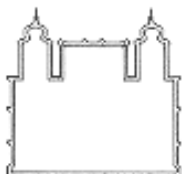
Figura 2: grade de uma câmara.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

180

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

7.2 – Montagem da câmara de Neubauer:

7.2.1 - Com um cotonete umedecido passar nas duas laterais das câmaras para a fixação da lamínula. Em seguida, fixar a lamínula sobre a câmara de Neubauer, pressionando levemente com os polegares tomando o cuidado para não tocar na parte que cobre as câmaras para não prejudicar a leitura, fazendo pequenos movimentos para cima e para baixo até sua fixação.

Para se certificar que a lamínula está devidamente fixada na câmara, inclina deixando-a verticalmente alinhada a bancada de trabalho, se não cair é porque está bem fixada.

7.2.2 - A lamínula é colocada sobre a câmara, cobrindo a área central. Ela serve para concentrar a amostra entre o fundo da câmara e a própria lamínula, deixando exatamente 0,1 mm nesse espaço (Figura 3).

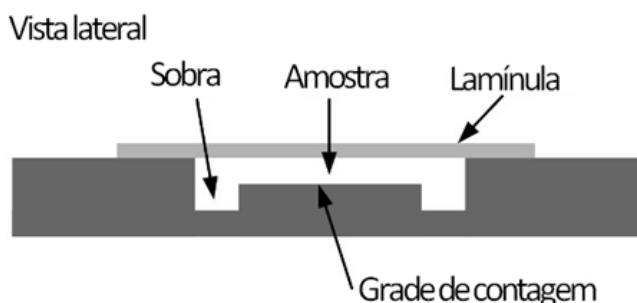


Figura 3: Vista lateral da câmara de Neubauer

7.3 - Diluição da amostra para contagem na Câmara de Neubauer:

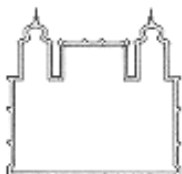
7.3.1 - Homogeneizar a cultura mãe para uma perfeita diluição;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

181

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

7.3.2 - Adicionar 900 μ L (0,9 mL) de PBS com a micropipeta e colocar no eppendorff;

7.3.3 - Coletar 100 μ L (0,1 mL) do tubo da amostra mãe com a micropipeta e colocar no eppendorff onde está o PBS fazendo uma diluição 1:10;

7.3.4 – Homogeneizar cuidadosamente o eppendorff fechado para não vazar, coletar novamente 100 μ L e adicionar 900 μ L de PBS (diluição 1:100) em um outro eppendorff;

7.3.5 - Pipetar cuidadosamente a amostra preenchendo apenas 1 lado da câmara (Figura 4).

OBSERVAÇÃO: Caso o número de células por quadrado ainda não esteja dentro da faixa ótima para contagem, procede-se nova diluição, ou seja 1:1000. E assim fazemos sucessivamente até que seja viável a contagem das células.

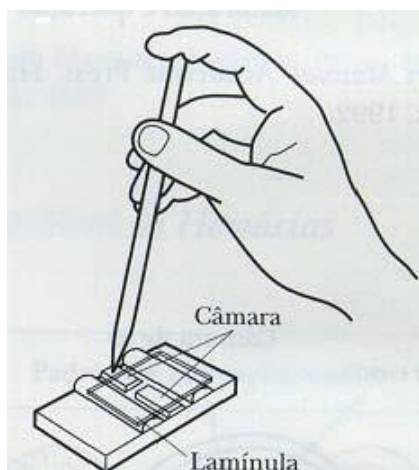


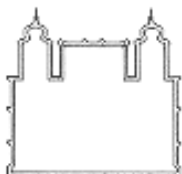
Figura 4: Câmara de Neubauer

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

182

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

7.3.6 - Contagem na câmara de Neubauer:

- Levar ao microscópio óptico e contar os parasitas presentes nos 4 setores da câmara de Neubauer seguindo o esquema da fig. 5, utilizando a objetiva de 20X e de 40X.

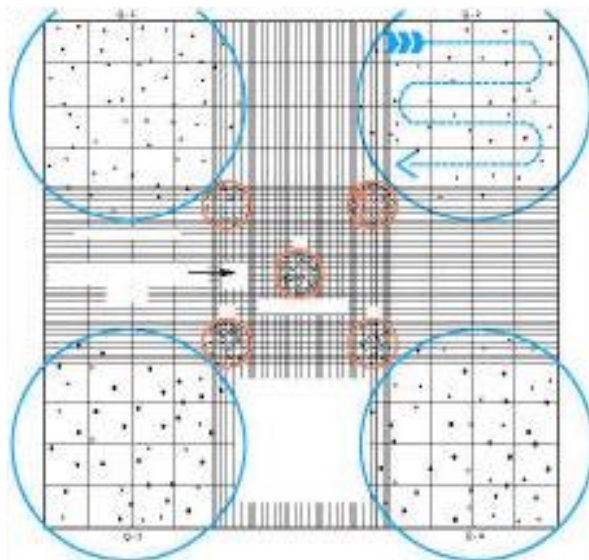


Figura 5: Apresentação dos 4 setores na câmara de Neubauer. A seta em azul indica como se deve contar os protozoários.

- O número de parasitas encontrados é então dividido por 4 para obter-se uma média em 0,1 μ L, multiplicado pelo fator de diluição e multiplicado pelo fator de correção da câmara de Neubauer.

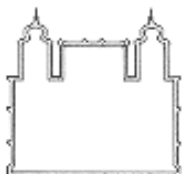
NOTA: Este fator de correção da câmara de Neubauer, é feito de seguinte forma:

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

183

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

Na obtenção do número de células/mL, multiplica o valor obtido por 10.000 ou 10^4 , pois 1 mL = 1 centímetro cúbico.

$$1 \text{ centímetro cúbico} = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$$

Na câmara de Neubauer obtemos o número celular por $0,1 \text{ mm}^3$, então devemos multiplicar por 10, portanto $10 \times 1.000 = 10.000$

- Assim temos:

$$(\text{n}^\circ \text{ total de células dividido por } 4) \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \text{ células/mL}$$

OBSERVAÇÕES:

- A pipeta de 100 μL é uma pipeta que facilita muito o carregamento da Câmara de Neubauer. Também se pode utilizar as pipetas de 50 μL .

- Contar grumos constituídos por células facilmente distinguíveis por seus núcleos e citoplasmas como grupos de células isoladas e contar cada célula;

- Grumos, cujas células são difíceis de serem distinguidas umas das outras, devem ser contados como um único grupo.

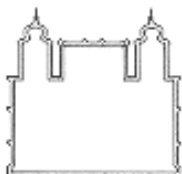
No caso de limpeza da câmara de contagem, higienizá-la com água, álcool a 70% ou sabão neutro. Enxague bem e limpe com lenço de papel.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

184

CÓDIGO

POP-COLPROT-016

TÍTULO

CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lucarini C. Adriana; Silva A. Leandro; Bianchi A.C. Reinaldo um sistema para a contagem semi-automática de microorganismos. Revista pesquisa & tecnologia FEI - Nº 26; 2004.

- Carvalho, W. F. Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-hematologia - 8ª Ed. Coopmed, 2008.

- Vieira, B. A. H. (2000) Como Utilizar a Câmara de Neubauer.
<http://starmedia.orbita.com/~bervieira>.

10. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

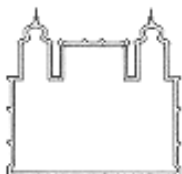
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

185

CÓDIGO

POP-COLPROT-017

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

COLORAÇÃO POR DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Preparar as células dos protozoários para observação ao microscópio de fluorescência através do marcador DAPI que tem afinidade ao DNA e quando ligado a este emite maior fluorescência.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

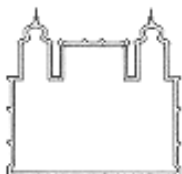
Este documento aplica-se a materiais biológicos.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

186

CÓDIGO

POP-COLPROT-017

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

3. DEFINIÇÕES

Não aplicável.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
PBS	Tampão Salina-Fosfato
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

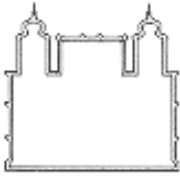
- Cultura em exponencial (10^7 células);
- Lamínulas e lâminas limpas e esterilizadas;
- Placa de petri;
- Parafilme;
- PBS;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

187

CÓDIGO

POP-COLPROT-017

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

- Paraformaldeído;
- DAPI;
- Nile Red;
- Poli-L-lisina
- Prolong Gold;
- Esmalte incolor;

7. PROCEDIMENTO

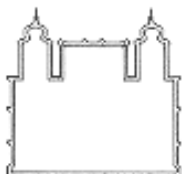
- Cultura exponencial com 10^7 células.
- Centrifugar as amostras a 1900 g por 15 min;
- Colocar as lamínulas na solução de etanol: éter (1:1);
- Em seguida lavar as lamínulas com a água destilada e deixar secar sobre o papel;
 - Remover o sobrenadante das amostras centrifugadas e deixar o sedimento no tubo;
 - Adicionar 2 mL de PBS nos tubos, homogeneizar e centrifugar as amostras para a primeira lavagem 1900 g por 15 min;
 - Repetir o processo acima;
 - Remover o máximo de sobrenadante;
 - Diluir 3 mL de paraformaldeído (Ci = 8%) em 3 mL de PBS (Cf = 4%) e centrifugar;
 - Remover o sobrenadante deixando o sedimento;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

188

CÓDIGO

POP-COLPROT-017

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

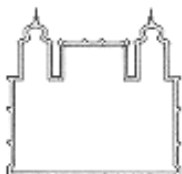
- Adicionar 1 mL do paraformaldeído à 4%;
- Esperar por 10 min para aderir nos organismos;
- Centrifugar as amostras a 1900 g por 10 min;
- Forrar uma superfície plana com um parafilme e nomear as marcações;
- Adicionar gotas de 15 µL de poly-L-Lysine;
- Colocar a lamínula sobre a gota poly-L-Lysine;
- Esperar por 10 min;
- Paralelamente, remover o sobrenadante do centrifugado com paraformaldeído deixando somente o pellet;
- Adicionar 1 mL de PBS para uma nova lavagem e homogeneizar a amostra;
- Centrifugar a 2000 g por 10 min;
- Em seguida, em uma placa, cobrir em outra superfície plana com parafilme, nessa mesma superfície, fazer marcações para separar as amostras;
- Cada lamínula (que estava com a poly-L-Lysine) deve ser lavada com PBS, remover o excesso da água das lamínulas e colocá-las na nova superfície coberta com parafilme, cada uma em suas respectivas amostras (virar o lado que estava em contato com a poly-L-Lysine para cima após a lavagem);
- Deixar as lamínulas secar na estufa a 37 °C;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

189

CÓDIGO

POP-COLPROT-017

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

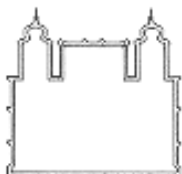
- Remover o sobrenadante do tubo contendo a cultura e adicionar 1,5 mL de PBS e homogeneizar;
- Após as lamínulas estarem secas, adicionar essa cultura nas lamínulas cobrindo-as por completo;
- Esperar 10 min para a cultura aderir nas lamínulas;
- Lavar as lamínulas com PBS e colocar para secar no papel;
- Diluir o reagente DAPI em PBS:
- 1 µL de DAPI para 999 µL de PBS;
- Colocar 15 µL (uma gota) na superfície plana forrada com parafilme;
- Colocar as lamínulas sobre as gotículas e cobrir com papel laminado (virar a parte que estava para cima, sobre o papel, para baixo, em contato com a gota);
- Esperar 10 min para o DAPI agir;
- Em seguida limpar as lâminas;
- Depois de 10 min, lavar todas as lamínulas com PBS e colocar para secar (colocar para secar com o lado que estava em contato com o DAPI para cima);
- Organizar e nomear as lâminas;
- Colocar uma gota de Prolong no centro das lâminas;
- Esperar o prolong secar;
- Cobrir as lâminas com o papel laminado durante o processo de secagem;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

190

CÓDIGO

POP-COLPROT-017

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO DAPI PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

- Selar as lamínulas nas lâminas com esmalte incolor, pincelando uma fina camada nas 4 bordas das lamínulas;
- Cobrir as lâminas novamente com o papel laminado e armazenar no freezer até a fotodocumentação;

OBSERVAÇÕES:

- A fluorescência pode durar 1 mês no freezer.
- O DAPI é um marcador fluorescente que se liga fortemente a regiões enriquecidas em adenina e timina em sequências de DNA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- https://pt.wikipedia.org/wiki/Microscopia_de_fluorescência
- https://www2.icb.ufmg.br/capi/wp.../10/POP_Confocal-Zeiss_5LIVE-atualizado.pdf

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

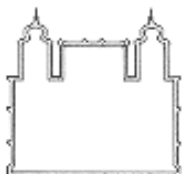
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

191

CÓDIGO

POP-COLPROT-018

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E VARREDURA

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas na fixação e processamento do material biológico para a microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a preparação de amostras para a microscopia eletrônica e varredura.

3. DEFINIÇÕES

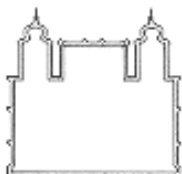
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

192

CÓDIGO

POP-COLPROT-018

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E VARREDURA

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

CACO	Cacodilato de sódio
COLPROT	Coleção de Protozoários
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GA	Glutaraldeído
PBS	Salina tampão fosfato
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

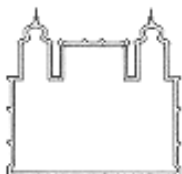
- Cultura em exponencial;
- Tubos de falcon 15 mL;
- Eppendorffs;
- PBS;
- Centrifuga;
- Glutaraldeído 25% (GA)
- Cacodilato de sódio 0,1 M (Caco)

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

193

CÓDIGO

POP-COLPROT-018

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E VARREDURA

7. PROCEDIMENTO

7.1. Preparação do material biológico:

- Preparar as soluções separadamente:
- A solução de cacodilato de sódio numa concentração a 0,1 M (pH 7,2).
- Solução de estoque de glutaraldeído a 25%.

OBSERVAÇÃO: O glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio para que fique na concentração de 2,5%, sendo usado para fixação na amostra;

- Cultura em fase exponencial, contendo no mínimo 10^7 células em tubos do tipo falcon de 15 mL;
- Centrifugar a amostra 2 vezes em PBS em 1400 g a 4 °C;
- Resuspender em PBS e colocar num eppendorff;
- Centrifugar e retirar o PBS;
- Resuspender o pellet em 1 mL de GA 2,5% em tampão de Caco a 0,1 M e guardar o eppendorff na geladeira até o dia do experimento.

7.2. Processamento do material biológico para a microscopia eletrônica de transmissão:

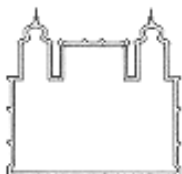
- Após a fixação do material lavar 3 vezes com o tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, 5 minutos para cada lavagem à temperatura ambiente.
- As células serão pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 1,25% diluídos em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, por 45 minutos, à temperatura ambiente.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

194

CÓDIGO

POP-COLPROT-018

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E VARREDURA

-Após a incubação, lavar o material no mesmo tampão por 3 vezes durante 5 minutos.

- Desidratação em graus crescente de acetona:

- Acetona 50% – 10 minutos;
- Acetona 60% – 10 minutos;
- Acetona 70% – 10 minutos;
- Acetona 80% – 10 minutos;
- Acetona 90% – 10 minutos;
- Acetona 100% (3x) – 10 minutos cada.

- Transferir a amostra para solução contendo volumes iguais de acetona absoluta e resina Epoxy por 16 horas;

- Após esse período, a amostra será infiltrada em resina Epoxy durante 6 horas;

- Emblocar em formas apropriadas, devidamente identificadas.

- Polimerização em estufa a 60 °C por 48 horas.

- Fazer a ultramicrotomia – para obtenção de cortes ultrafinos, com espessuras em torno de 60-70 nm e coletados em grades de cobre.

- Para a contrastação, os cortes serão submetidos a uma incubação com:

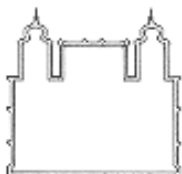
- Acetato de Uranila 5% e citrato de chumbo por 45 minutos;
- Lavar as grades contendo os cortes em água destilada e secá-las com papel filtro.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

195

CÓDIGO

POP-COLPROT-018

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E VARREDURA

- Observar o material no Microscópio Eletrônico de Transmissão.

7.3. Processamento do material biológico para a microscopia eletrônica de varredura:

- Após a fixação do material em glutaraldeído 2,5% diluído em PBS, pH 7,2, as amostras são lavadas nesta mesma solução 3 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente.

- Adesão das células sobre as lamínulas revestidas previamente com poli-L-lisina por 10 minutos, seguida de três lavagens sucessivas com PBS (pH 7,2).

- Pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M por 45 minutos.

- Lavar a amostra com PBS pH 7,2 por 3 vezes durante 5 minutos.

- Desidratação – série crescente de etanol:

- Etanol 50% – 10 minutos;
- Etanol 60% – 10 minutos;
- Etanol 70% – 10 minutos;
- Etanol 80% – 10 minutos;
- Etanol 90% – 10 minutos;
- Etanol 100% (3x) – 10 minutos cada.

- Após a etapa de desidratação, virá o ponto crítico;

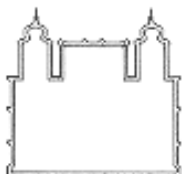
- Ponto Crítico: o processo permite a retirada de toda água da célula e dura cerca de 40 minutos na câmara de ponto crítico usando CO₂ líquido (em inglês CPD-Critical Point Dryer) em equipamento Leica EM CPD300.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

196

CÓDIGO

POP-COLPROT-018

TÍTULO

PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA E VARREDURA

- Em seguida a amostra deve ser montada em suporte metálico usando fita dupla aderente.

- Metalização: é depositada uma fina camada de ouro sobre a amostra com cerca de 20 a 30 nm de espessura, através de um sistema de evaporação conhecido como "sputtering", utilizando o aparelho Sputter Coater SCD 050, BalTec.

- Observar o material no Microscópio Eletrônico de Varredura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- http://www.uesc.br/centros/cme/arquivos/apostila_curso_cme.pdf

- Bozzola, J. J., and Russell, L. D. (1999). Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists illustrated. (Jones & Bartlett Learning).

- Padron, T. S. Soluções Tampão. In: Souza, W. Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica aplicada às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

- Abrahão D. S. et al. A comparative study on several fixatives applied in transmission electron microscopy procedure. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 63 (2):248 -54, 2004.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

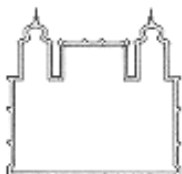
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

197

CÓDIGO

POP-COLPROT-019

TÍTULO

EXTRAÇÃO DE DNA

EXTRAÇÃO DE DNA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Extrair o DNA dos isolados.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA.

3. DEFINIÇÕES

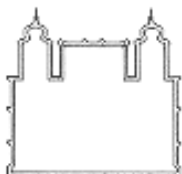
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

198

CÓDIGO

POP-COLPROT-019

TÍTULO

EXTRAÇÃO DE DNA

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão
TA	Temperatura ambiente

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento.

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

6.1 - Material:

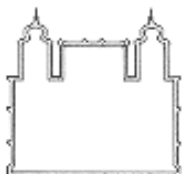
- Microtubos de polipropileno de 1,5 mL;
- Estantes para microtubos;
- Micropipetas de 1000, 200 e 10 µL;
- Ponteiras com filtros descartáveis (1000, 200 e 10 µL);
- Caneta;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

199

CÓDIGO

POP-COLPROT-019

TÍTULO

EXTRAÇÃO DE DNA

- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Kit: Wizard Genomic DNA Purifition - Promega

6.2 – Equipamento:

- Micro-centrífuga para microtubos;
- Agitador de tubos (tipo vortex);
- Câmara asséptica;

7. PROCEDIMENTO

7.1 - Preparo das células:

- 1- Centrifugar o tubo contendo a cultura de células (10^7 / mL) à velocidade de 3.000 rpm (735 g) durante 15 min (verifique a centrifugação ideal de acordo com a amostra analisada), para formar o pellet;
- 2 - Retirar o sobrenadante e adicionar 200 uL de PBS;
- 3 - Transferir a cultura para um microtubo de 1,5 mL;
- 4 - Homogeneizar o material com auxílio da micropipeta;
- 5 - Guardar no freezer a -20 °C até a extração.

7.2 – Procedimentos antes da extração do DNA:

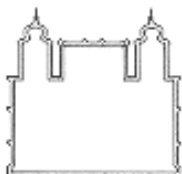
- 1 - Limpar a câmara asséptica e as pipetas automáticas com etanol a 70%;
- 2 - Utilizar ponteiras com filtros;
- 3 - Luvas (sem talco), microtubos livres de DNase (1,5 mL) tipo “ependorffs”;
- 4 – Micropipetas;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

200

CÓDIGO

POP-COLPROT-019

TÍTULO

EXTRAÇÃO DE DNA

5 - Todos os materiais descritos serão expostos a radiação ultra-violeta por 20 min;

7.3 – Extração do DNA:

1 - Identificar e datar os tubos;

2 - Para a extração utilizamos o Kit de extração é Promega wizard® Genomic DNA Purification (contém solução de lise celular, solução de lise nuclear, solução de precipitação de proteína, solução de hidratação de DNA);

3 – Ressuspender o pellet em 900 µL da solução de lise celular em um eppendorff de 1,5 mL;

4 – Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, misturando gentilmente 2 ou 3 vezes por inversão do tubo;

5 – Centrifugar a 15.000 g por 1 minuto a temperatura ambiente para separar o núcleo de outras organelas;

6 - Descartar o máximo possível de sobrenadante e usar o vortex vigorosamente para ressuspender o pellet (10 a 15 s);

7 - Adicionar 300 µL da solução de lise nuclear e homogeneizar o microtubo com auxílio de micropipeta, a mistura ficará muito viscosa, se necessário, adicionar mais solução de lise. A lise é praticamente imediata, vortexar por 20-30 seg;

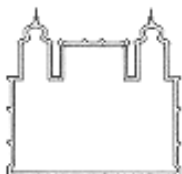
8 – PASSO OPCIONAL: Tratar com 1,5 µL de Rnase a 37 °C por 15 minutos agitando periodicamente, e depois resfriar a temperatura ambiente;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

201

CÓDIGO

POP-COLPROT-019

TÍTULO

EXTRAÇÃO DE DNA

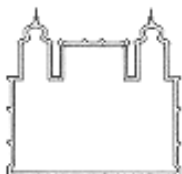
- 9 - Adicionar 100 μ L de solução de precipitação de proteínas;
- 10 - Homogeneizar no vortex vigorosamente por 20 a 30 segundos visualiza-se o precipitado disperso na solução (2 camadas que não se misturam);
- 11 - Centrifugar a 15.000 g por 3 minutos a temperatura ambiente observando a formação de um pellet escuro;
- 12 - Remover cuidadosamente o sobrenadante contendo o DNA e transferir para um novo tubo limpo;
- 13 – Em seguida, colocar 300 μ L de isopropanol e misturar delicadamente até o aparecimento de uma massa em suspensão, de 10 a 15 minutos (o líquido ficará viscoso como se fosse a mistura de água + óleo);
- 14 - Centrifugar o microtubo a 15.000 g por 1 minuto em temperatura ambiente e observar a formação de pellet claro;
- 15 - Retirar o sobrenadante cuidadosamente e desprezar;
- 16 - Adicionar 300 μ L de etanol a 70% (ETOH) a temperatura ambiente e inverter gentilmente o microtubo por várias vezes delicadamente por 5 minutos;
- 17 - Centrifugar por 5 minutos a 15.000 g na temperatura ambiente;
- 18 - Remover cuidadosamente o sobrenadante por pipetagem;
- 19 – Repetir os itens 15, 16, 17;
- 20 – Deixar o microtubo invertido sobre o papel de filtro em overnight até secar completamente o etanol, em temperatura ambiente;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

202

CÓDIGO

POP-COLPROT-019

TÍTULO

EXTRAÇÃO DE DNA

21 – No dia seguinte, adicionar a suspensão 100 µL de solução de hidratação de DNA;

22 – Dividir o conteúdo em dois eppendorffs (cada um eppendorff terá cerca de 50 µL de DNA);

23 - Estocar o DNA a 2-8 °C;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wizard genomic DNA purification/ Isolation of Genomic DNA from Animal Tissue Culture Cells Kit. Nº. Catalogo A1125 – Promega.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

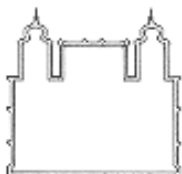
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

203

CÓDIGO

POP-COLPROT-020

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo gGAPDH.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA de isolados de cinetoplastídeos.

3. DEFINIÇÕES

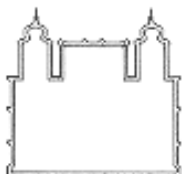
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

204

CÓDIGO

POP-COLPROT-020

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gGAPDH	Glicosomal Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Material para a preparação do PCR:

- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;

- Estante para microtubos;

- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;

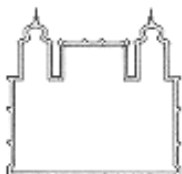
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

205

CÓDIGO

POP-COLPROT-020

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o alvo gGAPDH, Reverso (5'-CCCCACTCGTTRTCRTACC-3') e Forward (5'-GGBCGCATGGTSTTCCAG-3');
- Polimerase DNA Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

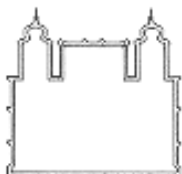
- Na capela de PCR:
- Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes;
- Limpar a capela com álcool a 70% e expor à luz ultra-violeta por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

206

CÓDIGO

POP-COLPROT-020

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

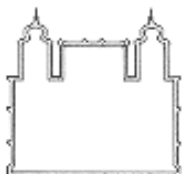
- Reagentes para a PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado (primers), o DNA a ser amplificado, a DNA polimerase (taq platinum), desoxinucleótídeos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão de reação 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- Se o volume total de cada reação for 50 μ L, cada eppendorff deverá receber 47 μ L de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 μ L mais 3 μ L de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

207

CÓDIGO

POP-COLPROT-020

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela de fluxo laminar.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Primer R	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Tampão de PCR	10 X	5 µL	50,0 µL
MgCl ₂	1,5 mM	2,5 µL	25 µL
dNTPs	200 µM	1 µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1 µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	35,25 µL	352,5,0 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

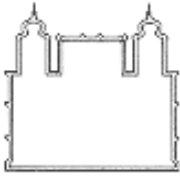
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

208

CÓDIGO

POP-COLPROT-020

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO gGAPDH

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;

- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 94 °C/1 min

Polimerização: 54 °C/2 min

Extensão: 72 °C/2 min

} 29X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário a eletroforese com gel de agarose a 1,5%.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borghesan, T. C. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies Protist, Vol. 164, 129–152, (2013).

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

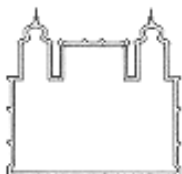
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

209

CÓDIGO

POP-COLPROT-021

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo V7V8.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA de isolados de cinetoplastídeos.

3. DEFINIÇÕES

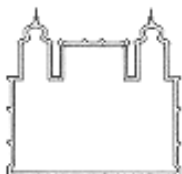
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

210

CÓDIGO

POP-COLPROT-021

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Material para a preparação do PCR:

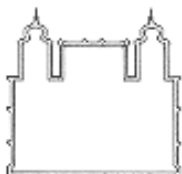
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

211

CÓDIGO

POP-COLPROT-021

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores - Primers Reverso (5-'CTGAGACTGTAACCTCAA-3') e Forward (5'-CACCCGCGGTAATTCCAGC-3');
- Polimerase DNA Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

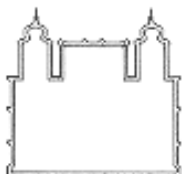
- Na capela de PCR:
- Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
- Limpar a capela com álcool a 70% e deixar na luz ultra-violeta por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

212

CÓDIGO

POP-COLPROT-021

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

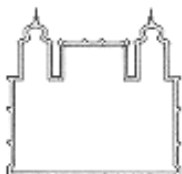
- Reagentes para a PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado (primers), o DNA a ser amplificado, a DNA polimerase (taq platinum), desoxinucleótidos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão de reação 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- O volume total de cada reação for 50 μ L, cada eppendorff deverá receber 47 μ L de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 μ L mais 3 μ L de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

213

CÓDIGO

POP-COLPROT-021

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela fluxo laminar.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Primer R	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Tampão de PCR	10 X	5 µL	50,0 µL
MgCl ₂	1,5 mM	2,5 µL	25,0 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	35,25 µL	352,5 µL
DNA extraído	15 ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

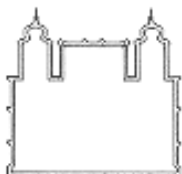
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

214

CÓDIGO

POP-COLPROT-021

TÍTULO

REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE – PCR ALVO 18S V7/V8

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;
- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 94 °C/30 seg

Polimerização: 54 °C/2 min

Extensão: 72 °C/2 min

} 35X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário realiza a eletroforese com gel de agarose (POP-028).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borghesan, T. C. Molecular Phylogenetic Redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a Genus of Insect Parasites Associated with Flies Protist, Vol. 164, 129–152, (2013).

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

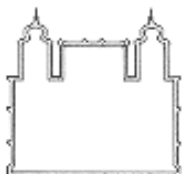
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

215

CÓDIGO

POP-COLPROT-022

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo Kineto80/651.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA de isolados de cinetoplastídeos.

3. DEFINIÇÕES

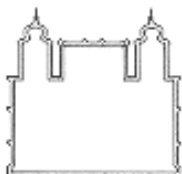
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

216

CÓDIGO

POP-COLPROT-022

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Material para a preparação do PCR:

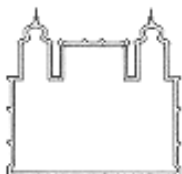
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

217

CÓDIGO

POP-COLPROT-022

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores - Primers Reverso (5'-TTGGTCGCRCTTYTTTGTAGTCACAG-3') e Forward (5'-CATCAGACGYAATCTGCCGC-3');

- Polimerase DNA Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

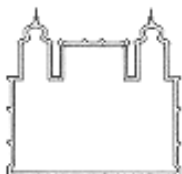
- Na capela de PCR:
 - Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
 - Limpar a capela com álcool a 70% e deixar na luz ultra-violeta por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

218

CÓDIGO

POP-COLPROT-022

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

- Reagentes para a PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado (primers), o DNA a ser amplificado, a DNA polimerase (taq platinum), desoxinucleótídeos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão de reação 10X;

- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;

- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;

- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;

- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);

- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;

- O volume total de cada reação for 50 μ L, cada eppendorff deverá receber 47 μ L de MIX;

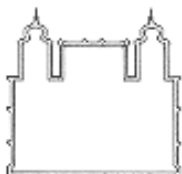
- No controle negativo acrescentar 47 μ L mais 3 μ L de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

219

CÓDIGO

POP-COLPROT-022

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela de fluxo laminar.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Primer R	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Tampão de PCR	10 X	5 µL	50,0 µL
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	25,0 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	35,25 µL	352,5 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

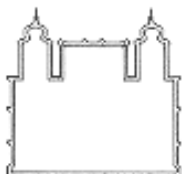
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

220

CÓDIGO

POP-COLPROT-022

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO 80/651

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;
- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 95 °C/40 seg

Polimerização: 58 °C/30 seg

Extensão: 72 °C/1 min

35X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário a eletroforese com gel de agarose a 1,5% (POP-028).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Glaser K., Primer pairs for the specific environmental detection and T-RFLP analysis of the ubiquitous flagellate taxa Chrysophyceae and Kinetoplastea. J Microbiol Methods. 2014. 100:8-16.

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

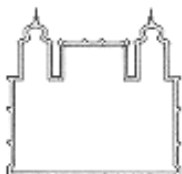
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

221

CÓDIGO

POP-COLPROT-023

TÍTULO

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo Kineto 14/2026.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA dos isolados primatas não-humanos.

3. DEFINIÇÕES

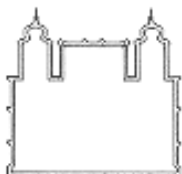
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

222

CÓDIGO

POP-COLPROT-023

TÍTULO

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Material para a preparação do PCR:

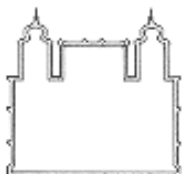
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

223

CÓDIGO

POP-COLPROT-023

TÍTULO

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores – Primers Reverso (5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTACAGCT-3') e Forward (5'-CTGCCAGTAGTCATATGCTTG TTTCAAGG A-3');
- Polimerase DNA Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

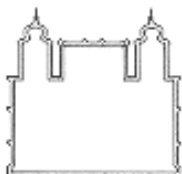
- Na capela de PCR:
- Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
- Limpar a capela com álcool a 70% e deixar na luz ultra-violeta por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

224

CÓDIGO

POP-COLPROT-023

TÍTULO

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

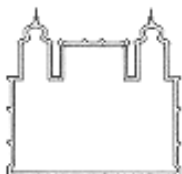
- Reagentes PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado ou segmento de DNA a ser amplificada, a polimerase de DNA taq platinum, oligonucleotídeos iniciadores (primers), desoxinucleotídeos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio (MgCl₂), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- O volume total de cada reação for 50 µL, cada eppendorff deverá receber 47 µL de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 µL mais 3 µL de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

225

CÓDIGO

POP-COLPROT-023

TÍTULO

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	2,5 µM	1,25 µL	12,5 µL
Primer R	2,5 µM	1,25 µL	12,5 µL
Tampão de PCR	10 X	5 µL	50,0 µL
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	25 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	34,75 µL	347,5 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

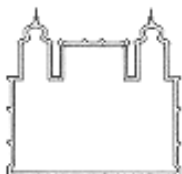
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

226

CÓDIGO

POP-COLPROT-023

TÍTULO

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR KINETO14/2026

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;

- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 94 °C/30 seg

Polimerização: 63 °C/36 seg

Extensão: 72 °C/1.5 min

} 35X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário que se faça eletroforese com gel de agarose a 1,5%.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Heyden S¹, Chao EE, Vickerman K, Cavalier-Smith T., Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomid flagellates and the evolution of euglenozoa. J Eukaryot Microbiol. 2004 Jul-Aug; 51(4):402-16.

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi: (10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

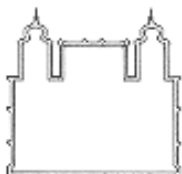
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

227

CÓDIGO

POP-COLPROT-024

TÍTULO

ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo EukA/EukB.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA dos isolados primatas não-humanos.

3. DEFINIÇÕES

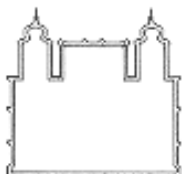
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

228

CÓDIGO

POP-COLPROT-024

TÍTULO

ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

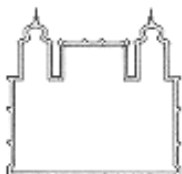
- Material para a preparação do PCR:
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiros com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

229

CÓDIGO

POP-COLPROT-024

TÍTULO

ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores - Primers Reverso (5'-GATCCTTCTGCAAGGTTACCTAC-3') e Forward (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3');
- DNA Polimerase Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

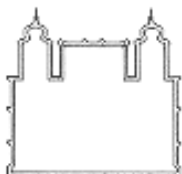
- Na capela de PCR:
 - Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
 - Limpar a capela com álcool a 70% e expor à luz ultra-violeta por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

230

CÓDIGO

POP-COLPROT-024

TÍTULO

ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

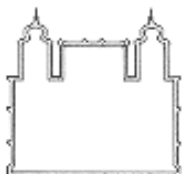
- Reagentes PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado ou segmento de DNA a ser amplificada, a polimerase de DNA taq platinum, oligonucleotídeos iniciadores (primers), desoxinucleotídeos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- O volume total de cada reação for 50 μL , cada eppendorff deverá receber 47 μL de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 μL mais 3 μL de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

231

CÓDIGO

POP-COLPROT-024

TÍTULO

ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	0,2 µL	2,0 µL
Primer R	0,2 µM	0,2 µL	2,0 µL
Tampão de PCR	10 X	5 µL	50,0 µL
MgCl ₂	1,5 mM	2 µL	20,0 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	37,35 µL	373,5 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

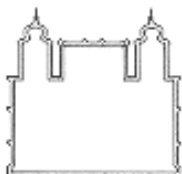
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

232

CÓDIGO

POP-COLPROT-024

TÍTULO

ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR EUKA/EUKB

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;
- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 94 °C/30 seg

Polimerização: 53.8 °C/30 seg

Extensão: 72 °C/2 min

35X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário que se faça eletroforese com gel de agarose a 1,5%.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012).

- Koid A., Nelson W.C., Mraz A., Heidelberg KB. Comparative analysis of eukaryotic marine microbial assemblages from 18S rRNA gene and gene transcript clone libraries by using different methods of extraction. Appl Environ Microbiol. 2012 Jun;78(11):3958-65.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

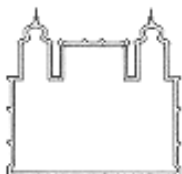
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

233

CÓDIGO

POP-COLPROT-025

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo LSU25/1440.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA dos isolados primatas não-humanos.

3. DEFINIÇÕES

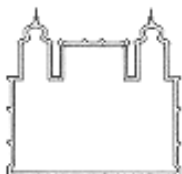
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

234

CÓDIGO

POP-COLPROT-025

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Material para a preparação da PCR:

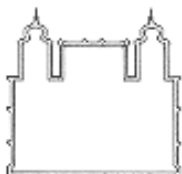
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

235

CÓDIGO

POP-COLPROT-025

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores - Primers Reverso (5'-TGCTGTTACATGGAACCTTTC-3') e Forward (5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATATA-3')

- DNA Polimerase Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

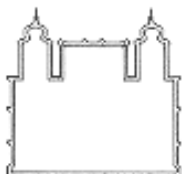
- Na capela de PCR:
 - Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
 - Limpar a capela com álcool a 70% e deixar na luz ultra-violeta por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

236

CÓDIGO

POP-COLPROT-025

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

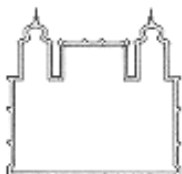
- Reagentes para a PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado (primers), o DNA a ser amplificado, a DNA polimerase (taq platinum), desoxinucleótidos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão de reação 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- O volume total de cada reação for 50 μ L, cada eppendorff deverá receber 47 μ L de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 μ L mais 3 μ L de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

237

CÓDIGO

POP-COLPROT-025

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Primer R	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Tampão de PCR	10 X	2,5 µL	25,0 µL
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	25,0 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	37,75 µL	377,5 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

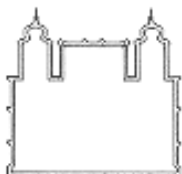
- Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

238

CÓDIGO

POP-COLPROT-025

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU 25/1440

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;

- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min.

Desnaturação: 94 °C/1 min.

Polimerização: 58.5 °C/2 min. } 35X (ciclos)

Extensão: 72 °C/3 min.

Extensão final: 72 °C/10 min.

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário que se faça eletroforese com gel de agarose a 1,5% (POP-028).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi:10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

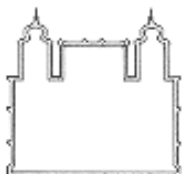
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

239

CÓDIGO

POP-COLPROT-026

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

PCR PARA O ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo LSU1275/689.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA dos isolados primatas não-humanos.

3. DEFINIÇÕES

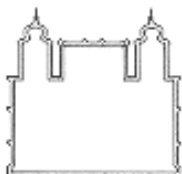
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

240

CÓDIGO

POP-COLPROT-026

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

- Material para a preparação do PCR:

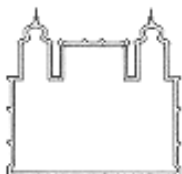
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

241

CÓDIGO

POP-COLPROT-026

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores - Primers Reverso (5'-'CACACTCCTTAGCGGA-3') e Forward (5'-GACCCGTCTTGAAACACGGA-3')

- DNA Polimerase Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

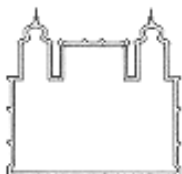
- Na capela de PCR:
- Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
- Limpar a capela com álcool a 70% e deixar na UV por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

242

CÓDIGO

POP-COLPROT-026

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

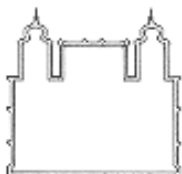
- Reagentes para a PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado (primers), o DNA a ser amplificado, a DNA polimerase (taq platinum), desoxinucleótidos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão de reação 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- O volume total de cada reação for 50 μ L, cada eppendorff deverá receber 47 μ L de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 μ L mais 3 μ L de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

243

CÓDIGO

POP-COLPROT-026

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Primer R	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Tampão de PCR	10 X	2,5 µL	25,0 µL
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	25,0 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	37,75 µL	377,5 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

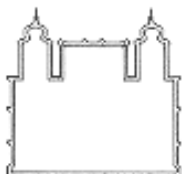
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

244

CÓDIGO

POP-COLPROT-026

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR LSU1275/689

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;
- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 94 °C/45 seg

Polimerização: 58 °C/1 min

Extensão: 72 °C/1 min

35X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário que se faça eletroforese com gel de agarose a 1,5% (POP-028).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Markmann M, Tautz D, Reverse taxonomy: In approach towards determining the diversity of meiobenthic organisms based on ribosomal RNA signature sequences. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005 Oct 29;360 (1462):1917-24.

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi: (10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

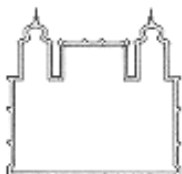
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

245

CÓDIGO

POP-COLPROT-027

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

PCR PARA O ALVO 18 S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da técnica do PCR pelo alvo SSU18S.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA dos isolados primatas não-humanos.

3. DEFINIÇÕES

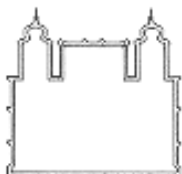
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

246

CÓDIGO

POP-COLPROT-027

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

BSA	Soro de albumina bovina
COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

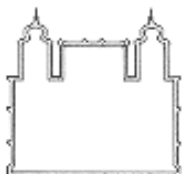
- Material para a preparação da PCR:
- Microtubos de polipropileno de 0,2 mL e 1,5 mL estéreis e novos;
- Estante para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL, 200 µL, 1000 µL;
- Ponteiros com filtro descartáveis (10 µL, 200 µL, 1000 µL);

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

247

CÓDIGO

POP-COLPROT-027

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

- Caneta;
- Luva sem talco;
- Recipiente para descarte;
- Um par de oligonucleotídeos iniciadores - Primers Reverso (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTA-3') e Forward (5'-AATCTGGTTGATCCTGCCAG-3');
- Polimerase DNA Taq platinum - DNA polimerase termoestável;
- Deoxinucleotídeos trifosfatos – dNTPs;
- Tampão 10X para manter o pH;
- MgCl₂ – Cofator enzimático para o DNA polimerase;
- BSA - Soro de albumina bovina;
- Água purificada e esterilizada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);
- Capela de PCR;
- Termociclador;
- Placa de gelo ou gelo picado;

7. PROCEDIMENTO:

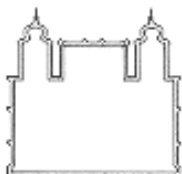
- Na capela de PCR:
- Usar luvas para evitar contaminação na mistura de reação ou dos reagentes.
- Limpar a capela com álcool a 70% e deixar na UV por 20 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

248

CÓDIGO

POP-COLPROT-027

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

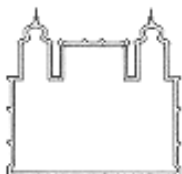
- Reagentes para a PCR incluem um conjunto de iniciadores apropriados para o gene alvo desejado (primers), o DNA a ser amplificado, a DNA polimerase (taq platinum), desoxinucleótidos (dNTPs), água estéril, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), Soro de albumina bovina (BSA) e o tampão de reação 10X;
- Organizar todos os reagentes necessários para o experimento de PCR em uma placa de gelo ou no gelo picado, deixando-os descongelar completamente antes de configurar uma reação;
- Manter os reagentes no gelo durante todo o experimento;
- Dentro da capela, numa estante para tubos colocar, identificar e datar os eppendorffs de 0,2 mL e 1,5 mL;
- Para realizar várias reações com os mesmos reagentes (exceto pelo DNA), deverão ser combinados em uma mistura mestre (MIX). Essa solução de reação pode ser feita num tubo de eppendorff de 1,5 mL empregando X vezes o número de reações experimentais mais o controle negativo (sem o DNA alvo) e se possível um controle positivo (Tabela 1);
- Este MIX, será distribuído em vários eppendorffs de 0,2 mL;
- O volume total de cada reação for 50 μ L, cada eppendorff deverá receber 47 μ L de MIX;
- No controle negativo acrescentar 47 μ L mais 3 μ L de água destilada;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

249

CÓDIGO

POP-COLPROT-027

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

OBSERVAÇÃO: A capela de PCR será usada exclusivamente para a preparação do MIX. O DNA alvo (3 µL) deverá ser colocado, em uma outra capela.

Tabela 1: Tabela de reagentes:

Reagentes	Concentração	Volume	10X MIX (10 reações)
Primer F	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Primer R	0,2 µM	1 µL	10,0 µL
Tampão de PCR	10 X	2,5 µL	25,0 µL
MgCl ₂	2,5 mM	2,5 µL	25,0 µL
dNTPs	200 µM	1µL	10,0 µL
BSA	0,05%	1µL	10,0 µL
Taq platinum	1,5 U	0,25 µL	2,5 µL
Água estéril	-----	37,75 µL	377,5 µL
DNA extraído	15ng/µL	3 µL	30,0 µL
Volume total	-----	50 µL	500 µL

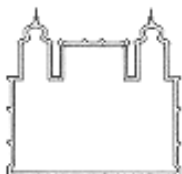
Após o preparo das reações, fechar os eppendorffs e colocá-los no termociclador;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

250

CÓDIGO

POP-COLPROT-027

TÍTULO

PCR PARA O ALVO 18S USANDO OLIGONUCLEOTÍDEO INICIADOR SSU18S

- Uma vez fechado o termociclador, iniciar o programa;
- Cada ciclo de amplificação deverá ser composto por:

Desnaturação inicial: 94 °C/5 min

Desnaturação: 94 °C/1 min
Polimerização: 58 °C/1 min
Extensão: 72 °C/3 min

} 35X (ciclos)

Extensão final: 72 °C/10 min

Temperatura final 4 °C ∞

- Para obter a fotodocumentação do resultado do PCR é necessário que se faça eletroforese com gel de agarose a 1,5% (POP-028).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lorenz, T.C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi: 10.3791/3998 (2012).

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

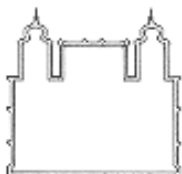
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

251

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da eletroforese em gel de agarose.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

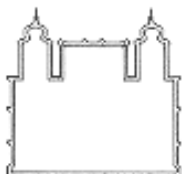
Este documento aplica-se a realização de eletroforese para análise de DNA.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

252

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

3. DEFINIÇÕES

Não aplicável.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

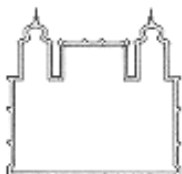
- Câmara fotográfica;
- Agarose;
- Tampão TBE;
- Padrão de massa molecular;
- DNA alvo amplificado;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

253

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

- Corante marcador de corrida;
- GelRed;
- Água destilada;
- Mesa para nivelamento;
- Erlenmeyer (50 mL);
- Pipetas volumétricas (5 e 10 mL);
- Recipiente de descarte;
- Espátula de plástico;
- EPI;
- Fonte;
- Sistema de eletroforese;
- Microondas;
- Balança;
- Transluminador;

7. PROCEDIMENTO:

7.1. Montagem do Sistema:

- Posicionar a cuba branca de acrílico (BioRAD).
- Posicionar o nível, no interior do suporte para o gel.
- Observar o nivelamento ajustando o nível bolha.

7.2. Preparo do gel de agarose 1,5%:

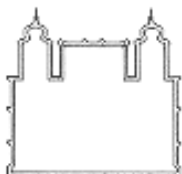
- Pesar 1,5 g de agarose e adicionar em um Erlenmeyer de 125 mL.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

254

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

- Adicionar 100 mL de Tampão TBE 0,5 X (Tris 1,1 M; Ácido Bórico 0,9 M; EDTA 25 mM, pH 8.3). Este tampão é preparado e estocado 10X concentrado.

- Levar ao microondas, até ficar transparente, (em torno de 20 s).
Atenção: Não pode ferver.

- Resfriar em água corrente.

- Transferir a agarose fundida para o suporte, colocar o pente e deixar solidificar à temperatura ambiente.

- Transferir o suporte contendo o gel solidificado para a cuba de eletroforese.

- Retirar o pente e adicionar o tampão TBE 0,5X até cobrir o gel (o tampão tem que ficar 1 cm acima do gel).

7.3. Aplicação do padrão de peso molecular, controles e amostras no gel:

- Preencher o protocolo de quadro de disposição das amostras no gel (protocolo das amostras).

- Aplicar no primeiro poço do gel, uma mistura de 5 μ L, contendo 3 μ L do padrão de peso molecular (1pb) com 2 μ L do corante marcador de corrida/GelRed.

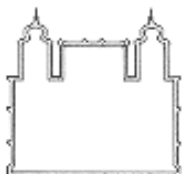
- Misturar 6 μ L de cada amostra com 2 μ L de corante marcador de corrida/GelRed e imediatamente aplicar no orifício do gel previamente determinado.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

255

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

7.4. Corrida:

- Posicionar a tampa do equipamento com o polo negativo (fio preto) correndo para o polo positivo (fio vermelho).
- Ligar a fonte de eletroforese (BioRad) colocando o pino preto na tomada de cor preta e pino vermelho na tomada vermelha.
- Ajustar a corrida para 80 volts.
- Deixar correr as bandas no gel até 2 cm antes de terminar o gel.
- Desligar a máquina de eletroforese.
- Transferir o gel da cuba para um recipiente de plástico e imediatamente realizar a coloração com GelRED.

7.5. Coloração com GelRED 3X:

- Fazer uma Diluição de 1:500 GelREd (10.000).

7.6. Interpretação do Teste:

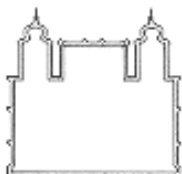
- O Teste será considerado válido quando o(s) controle(s) negativo(s) não apresentarem banda no gel e o(s) controle(s) positivo (s) apresentarem a banda característica com o tamanho esperado.
- A visualização do perfil semelhante ao controle positivo indica amostra positiva.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

256

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

Instituto Oswaldo Cruz –
Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia

PROTOCOLO DE ELETROFORESE
EM GEL DE AGAROSE

Data: ___/___/___

1. Identificação das amostras

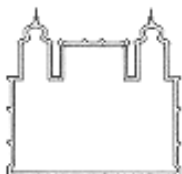
Tubo PCR	Identificação	Origem das amostras	Resultado EGA

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

257

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

Disposição das amostras no Gel

Cavidades do Gel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tubo												
Resultado												

Imagem do Gel de Agarose 1,5 %

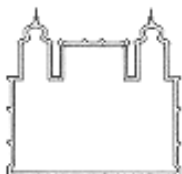
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

258

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

Material

Reagentes	Fabricante / OP.	Lote	Quantidade
Agarose			1,5 g
Tampão TBE			100 mL
Padrão de peso molecular DNA			5 µL / amostra
Corante marcador corrida			1 µL / amostra
GelRed			1 µL / amostra

Corrida Eletroforética

Condições de Corrida

80 volts

mA

h: min

Tempo Total de
Corrida

Início

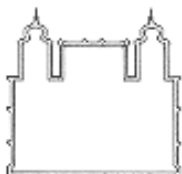
Término

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

259

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

Tabela da porcentagem do gel do Agarose e da escala de eficiência da separação

Porcentagem de agarose no Gel % (peso/vol)	Escala de eficiência de separação DNA linear (kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

Ref. Molecular cloning: A laboratory manual. Sambrook, Fritsch & Maniatis

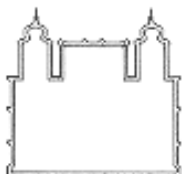
OBSERVAÇÃO: Quanto mais concentrado for o gel, maior o poder de separação das bandas, porém os fragmentos devem estar numa faixa mais restrita de tamanho, por exemplo, um gel de agarose a 2,5% pode-se separar fragmentos com diferença de no mínimo 30 pares de bases, mas este sistema não será capaz de separar fragmentos acima de 2 kb.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

260

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

Cálculo de concentração do gel:

- Pesar 1 g agarose/100 mL de TBE - corresponde a concentração do gel a 1%.
- 1,5 g de agarose/100 mL de TBE - corresponde a concentração do gel a 1,5%.
- 2 g de agarose/100 mL de TBE - corresponde a concentração do gel a 2%.
- Fazer uma regra de proporção para calcular o volume e a concentração desejada

Coloração do gel:

Coloração em GelRED 3 X conforme item 7.5

Visualização e fotodocumentação

Câmara fotográfica digital acoplado a um trans-iluminador com luz ultra-violeta. Atenção, o operador deve proteger-se da exposição aos raios ultravioletas através de barreiras de vidro ou acrílico. O uso de óculos de acrílico é imprescindível.

Diluição do padrão de massa molecular de DNA

10 µL de padrão de massa molecular

20 µL do tampão de amostra

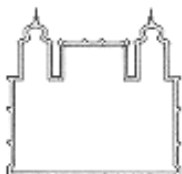
70 µL de água (livre de DNA)

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

261

CÓDIGO

POP-COLPROT-028

TÍTULO

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE PARA ANÁLISE DE DNA

Preparo do tampão de amostra (*loading buffer 6X*): Adaptado de Sambrook e Russel (2001).

Azul de bromofenol 0,25%

Xileno cianol 0,25%

Glicerol 30% (completar com água destilada q.s.p. 100 mL)

Para preparar 50 mL

Azul de bromofenol 0,125 g

Xileno cianol 0,125 g

Glicerol 30% 1,5 mL (completar com água destilada q.s.p. 50 mL)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

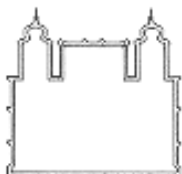
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 º andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

262

CÓDIGO

POP-COLPROT-029

TÍTULO

PURIFICAÇÃO DE DNA

PURIFICAÇÃO DE DNA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização da purificação de DNA após a amplificação.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a purificação de DNA após a amplificação para realização da reação de sequenciamento

3. DEFINIÇÕES

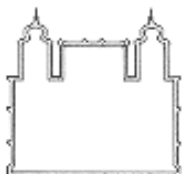
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

263

CÓDIGO

POP-COLPROT-029

TÍTULO

PURIFICAÇÃO DE DNA

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão
TA	Temperatura ambiente

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

6.1 - Material:

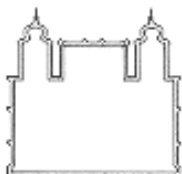
- Microtubos de polipropileno de 1,5 mL;
- Estantes para microtubos;
- Micropipetas de 1000, 200 e 10 µL;
- Ponteiras com filtros descartáveis (1000, 200 e 10 µL);
- Caneta;
- Luva sem talco;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

264

CÓDIGO

POP-COLPROT-029

TÍTULO

PURIFICAÇÃO DE DNA

- Recipiente para descarte;

6.2 – Equipamento:

- Microcentrífuga para microtubos;

7. PROCEDIMENTO:

- Utilizar o fluxo laminar;

- Limpar o fluxo e as pipetas automáticas com etanol a 70%;

- Utilizar ponteiras com barreira;

- Luvas (sem talco), microtubos (1,5 mL) tipo “ependorff”;

- Pipetas 1000, 200, 10 µL (não pode ser usada as pipetas da sala de extração e da capela de amplificação de DNA);

- Recipiente para descarte;

- Todos os materiais descritos serão expostos a radiação ultravioleta por 20 min.

7.1 – Purificação:

7.1.1 – Preparo da solução de lavagem, “wash solution”:

- Adicionar 75 mL (no caso do kit para 50 reações) de etanol a 95 °C (alta purificação) na amostra;

- Datar o frasco de wash solution e manter fechado para evitar a evaporação do etanol;

7.1.2 – Etapa de purificação do produto de PCR:

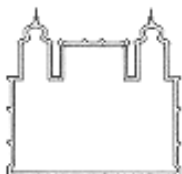
- Identificar o microtubo correspondente a cada amostra;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

265

CÓDIGO

POP-COLPROT-029

TÍTULO

PURIFICAÇÃO DE DNA

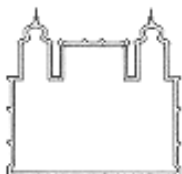
- Adicionar no microtubo o produto da PCR e em seguida adicionar um volume igual de solução “membrane binding solution” (solução de ligação de DNA à membrana). Por exemplo: 50 µL de produto de PCR para 50 µL de membrane binding solution;
- Transferir a solução homogeneizada para um novo microtubo contendo uma microcoluna;
- Incubar o microtubo por 1 min na temperatura ambiente;
- Centrifugar o microtubo contendo a microcoluna a 10.000 g (14.000 rpm) por 1 min;
- Remover a microcoluna e descartar o microtubo contendo o líquido;
- Colocar a microcoluna em um novo microtubo identificado;
- Adicionar a microcoluna 700 µL de solução “membrane binding solution” (solução de ligação de DNA à membrana) previamente diluída em etanol a 95 °C;
- Centrifugar o microtubo a 10.000 g (14.000 rpm) por 1 min;
- Descartar o líquido do microtubo sem tocar na microcoluna;
- Adicionar na microtubo 500 µL da solução “membrane binding solution”; (solução de ligação à membrana);
- Centrifugar o microtubo contendo a microcoluna a 10.000 g (14.000 rpm) por 5 min;
- Descartar o líquido do tubo sem tocar na microcoluna;
- Centrifugar novamente o microtubo contendo a microcoluna a 10.000 g (14.000 rpm) por 1 min;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

266

CÓDIGO

POP-COLPROT-029

TÍTULO

PURIFICAÇÃO DE DNA

- Transferir a microcoluna para um novo microtubo identificado;
- Adicionar 50 µL de água livre de nuclease na microcoluna, sem tocar no filtro nem na parede da microcoluna;
- Incubar o microtubo por 1 min na temperatura ambiente;
- Centrifugar o microtubo a 10.000 g (14.000 rpm) por 1 min;
- Descartar a microcoluna e armazenar o microtubo com o produto de PCR purificado a 4 °C;

OBSERVAÇÃO: Para a purificação em gel 10 µL de solução de membrana de ligação para 10 mg de gel contendo banda e incubar na temperatura de 50-56 °C;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wizard SV gel and PCR Clean Up system Kit nº catalogo A9281 – Promega.

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

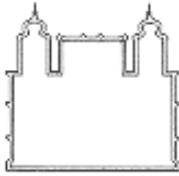
Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

267

CÓDIGO

POP-COLPROT-030

TÍTULO

SEQUENCIAMENTO DE DNA

SEQUENCIAMENTO DE DNA

SUMÁRIO

1. *Objetivo*
2. *Campo de Aplicação*
3. *Definições*
4. *Siglas*
5. *Responsabilidades*
6. *Material*
7. *Procedimento*
8. *Referências Bibliográficas*
9. *Histórico da última revisão*

1. OBJETIVO

Orientar profissionais da Coleção de Protozoários sobre a padronização, condições, recomendações que devem ser aplicadas para a realização do sequenciamento do DNA alvo.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este documento aplica-se a extração de DNA dos isolados primatas não-humanos.

3. DEFINIÇÕES

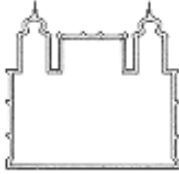
Não aplicável.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

268

CÓDIGO

POP-COLPROT-030

TÍTULO

SEQUENCIAMENTO DE DNA

4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

COLPROT	Coleção de Protozoários
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Equipamento de proteção individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
POP	Procedimento Operacional Padrão
TA	Temperatura ambiente

5. RESPONSABILIDADES

5.1. Curador

Aprovar o documento;

5.2. Técnicos

Executar a atividade de acordo com este POP.

6. MATERIAL

Material para a preparação do sequenciamento:

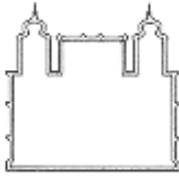
- Microtubos de polipropileno tipo Eppendorf de 1,5 mL ou similar;
- Estantes para microtubos;
- Micropipetas de 10 µL;
- Ponteiras com filtro descartáveis (10 µL);
- Caneta;
- Luva sem talco;

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

269

CÓDIGO

POP-COLPROT-030

TÍTULO

SEQUENCIAMENTO DE DNA

- Recipiente para descarte;
- Primer Reverso e Forward;
- Água purificada;
- DNA alvo extraído do isolado (POP-019);

7. PROCEDIMENTO:

7.1- Preparo do material para sequenciamento Reverso:

- Identificar e datar o eppendorff;
- Adicionar no eppendorff 1,0 µL do primer de 3,2 pmol/ uL Reverd
- Adicionar no eppendorff 3,5 µL de H₂O destilada;
- Adicionar no eppendorff 3,0 µL de DNA purificado;

Observação: O volume final do sequenciamento é 10 µL.

7.2 – Preparo do material para sequenciamento Forward:

- Identificar e datar o eppendorff;
- Adicionar no eppendorff 1,0 µL do primer de 3,2 pmol/ uL;
- Adicionar no eppendorff 3,5 µL de H₂O destilada;
- Adicionar no eppendorff 3,0 µL de DNA purificado;

Observação: O volume final do sequenciamento é 10 µL.

7.3 - Na plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ acrescentar:

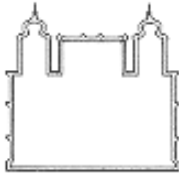
- Adicionar 1,0 µL Big Dye Mix;
- Adicionar 1,5 µL de tampão de sequenciamento 5X.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Coleção de Protozoários
Av. Brasil, 4365, Pavilhão Artur Neiva, 2 ° andar sala14
21040-900 – Rio de Janeiro – RJ – BRASIL
Tel.: (21) 2562-1009

POP - PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

REVISÃO

00

PÁGINA

270

CÓDIGO

POP-COLPROT-030

TÍTULO

SEQUENCIAMENTO DE DNA

OBSERVAÇÃO: As Sequencias serão obtidas na forma de cromatograma ou eletroferograma.

7.4 – As sequencias serão editadas e analisadas pelo programa Programa SeqMan DNASTAR;

- É necessário saber as sequencias dos Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no sequenciamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-<https://www.thermofisher.com/br/en/home/lifescience/sequencing/fragment-analysis/fragment-analysisfundamentals>.

-<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/24105/1/ct022.pdf>

9. HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Primeira edição do documento.

ELABORADO

VERIFICADO

APROVADO

DATA