

MANUAL DE PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS E AGENTES PARA EXTRAÇÃO DE DNA E RNA POR ESFERAS MAGNÉTICAS

Sumário

Lista de Siglas e Expressões Utilizadas.....	1
I. INTRODUÇÃO.....	2
II. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	3
1. <i>Bactérias</i>	3
2. <i>Fungos</i>	3
3. <i>Meio de transporte VTM/PBS</i>	3
4. <i>Hemocultura</i>	3
5. <i>Outras culturas microbianas</i>	4
6. <i>Fezes</i>	4
7. <i>Escarro</i>	4
8. <i>Urina</i>	5
9. <i>Saliva</i>	5
10. <i>Plasma/Soro</i>	6
11. <i>Líquor (Líquido Cefalorraquidiano - LCR)</i>	6
12. <i>Amostras de Líquidos Corporais: Lavado broncoalveolar (BALF) e Líquidos de Derrames (Derrame pleural/Ascite/Derrame pericárdico)</i>	6
13. <i>Amostras de Tecidos/Biópsias (Músculos ou Órgãos)</i>	6
14. <i>Materiais Citológicos/ Swabs Orais/Swab Nasofaríngeo (Sobrenadante de Cultura Celular ou Células em Pellet)</i>	6
15. <i>Raspados de Células Epiteliais (ex.: Raspados Cervicais)</i>	7
16. <i>Raspados de Superfície</i>	7
17. <i>Helmintos/Protozoários</i>	7
III. Perguntas Frequentes	8

Lista de siglas e expressões utilizadas

Lista de Siglas e expressões Utilizadas

PBS: Phosphate-Buffered Saline (Solução salina tamponada com fosfato). Solução usada para lavagem e suspensão de células e amostras.
VTM: Viral Transport Medium (Meio de transporte viral). Meio utilizado para conservar vírus viáveis durante transporte.
PK: Proteinase K. Enzima que degrada proteínas, facilitando a liberação dos ácidos nucleicos.
LBA: Lavado broncoalveolar. Amostra obtida do trato respiratório inferior para investigação de infecções pulmonares.
CSF: Cerebrospinal Fluid (Líquor). Fluido corporal usado para diagnóstico de infecções do sistema nervoso central.
SDS: Dodecil sulfato de sódio (detergente aniônico). Agente de lise usado para romper membranas celulares.
DTT: Ditionitreitol. Agente redutor usado para quebrar pontes de dissulfeto e liquefazer muco.
Solução PPS: Solução de polifenileno sulfeto. Usada para precipitar polissacarídeos e sais biliares.
ECS: Solução extracelular. Comumente usada para lavagem de células durante o processo de cultura celular.
DPBS: Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco. Principalmente usada para lavagem e suspensão de células frágeis.

I. INTRODUÇÃO

O sucesso da extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) a partir de amostras clínicas e laboratoriais depende fortemente do estado inicial do material biológico. Diferentes tipos de amostras possuem características físico-químicas e complexidades distintas, que podem impactar diretamente a eficiência do processo de lise celular e a recuperação do material genético.

O uso de esferas magnéticas em protocolos automatizados ou semiautomatizados requer que a amostra esteja adequadamente preparada, livre de inibidores e com conteúdo celular ou viral acessível. Portanto, a etapa de pré-tratamento desempenha um papel essencial na padronização, reprodutibilidade e sensibilidade da detecção de patógenos ou análise genética. Estes protocolos de pré-tratamento são sugestões e podem requerer adaptações dependendo da amostra, da disponibilidade de reagentes ou das condições do laboratório. Este manual apresenta diretrizes práticas para o pré-processamento de diversos tipos de amostras, considerando também as peculiaridades de cada grupo de microrganismos.

Nota técnica 1: Variedade de amostras e agentes.

O Kit de Extração de DNA e RNA por Esferas Magnéticas foi projetado e testado para uso com uma ampla variedade de amostras biológicas e diversos patógenos. Contudo, por se tratar de um kit preparatório com aplicação ampla e não específica, não é viável validar previamente todos os possíveis patógenos.

Nota técnica 2: Reagentes, soluções e insumos.

Os reagentes, soluções e insumos mencionados nos protocolos de pré-tratamento (como Proteinase K, Liticase, lisozima e meios de transporte) não estão incluídos no Kit de Extração de DNA e RNA. É responsabilidade do usuário adquiri-los separadamente conforme a necessidade do protocolo.

Nota técnica 3: Tipo de swab e interferências.

O tipo de swab utilizado para a coleta impacta diretamente a eficiência da extração de DNA/RNA. Recomenda-se evitar swab com cabo de madeira ou ponta de algodão, pois podem conter compostos inibitórios ou dificultar a liberação do material genético. Prefira swab com cabos plásticos e pontas de Rayon, poliéster ou nylon flocado, que apresentam maior rendimento e são compatíveis com protocolos automatizados. Swabs secos devem ser evitados, a menos que processados imediatamente. A escolha do swab é especialmente crítica em amostras com baixa carga celular ou viral.

NOTA: Este manual poderá ser atualizado regularmente para incluir melhorias e novas informações.

II. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

1. Bactérias

- **Bactérias Gram-positivas:**
 - Coletar 1-5 ml do meio de cultura bacteriana, centrifugar a 12.000 g por 30 segundos.
 - Descartar o sobrenadante e adicionar 300 µl de PBS. Vortexar para ressuspender as colônias bacterianas.
 - Adicionar 10-20 µl de lisozima 100 mg/ml, vortexar por 10 segundos e incubar a 37°C por 30 minutos. Prosseguir para o processo de extração.
- **Bactérias Gram-negativas:**
 - Adicionar 300 µl de PBS em um tubo de centrífuga de 1,5 ml. Usar uma alça de inoculação estéril para raspar uma quantidade adequada de colônias e lavá-las na solução. Vortexar para ressuspender as colônias.
 - Adicionar 20 µl de Proteinase K 20 mg/ml, vortexar por 10 segundos e incubar a 56°C por 30 minutos. Prosseguir para o processo de extração.

2. Fungos

Os fungos possuem paredes celulares relativamente resistentes, portanto, requerem pré-tratamento mais complexo.

- Coletar uma quantidade adequada de micélio/colônias usando uma alça de inoculação estéril, eluir em 500 µl de PBS estéril, vortexar e misturar por 10 segundos, centrifugar a 4000 g por 3 minutos e descartar o sobrenadante.
- Ressuspender o precipitado com 1 mL de PBS pré-resfriado (contendo 0,1% de Tween-20 ou Triton 100X), vortexar por 1 min. Adicionar Liticase (50 U/mL) a 30 °C por 45 min, em seguida adicione a Proteinase K 20 mg/ml e 4M isotiocianato de guanidina (opcional) a 55 °C por 30-60 min.
- Adicionar 300 µl de DTT 0,1M ao precipitado e misturar bem. Incubar a 32°C por 30 minutos, centrifugar a 4000 g por 3 minutos e descartar o sobrenadante.
- Adicionar 300 µl de PBS estéril, vortexar e misturar por 10 segundos, centrifugar a 4000 g por 5 minutos para remover o sobrenadante. Repetir uma vez.
- Adicionar 300 µl de PBS estéril, vortexar e misturar por 10 segundos, prosseguir para o processo de extração.

3. Meio de transporte VTM/PBS

Geralmente não é necessário pré-tratamento.

Usar 300 µl da amostra para prosseguir com o processo de extração.

4. Hemocultura

- Retirar 1-2 ml do líquido de cultura da garrafa de hemocultura positiva, centrifugar a 500g por 5 minutos, coletar o sobrenadante e centrifugar novamente a 12.000g por 10 minutos, descartar o sobrenadante. Adicionar 300 µl de PBS ao precipitado e vortexar para ressuspender o precipitado.
- Adicionar 10-20 µl de lisozima 100 mg/ml à solução bacteriana ressuspensa, vortexar por 10 segundos e incubar a 37°C por 30 minutos. Adicionar 20 µl de Proteinase K 20 mg/ml, vortexar por 10 segundos e incubar a 56°C por 30 minutos. Prosseguir para o

processo de extração.

5. Outras culturas microbianas

Culturas microbianas de outros substratos podem seguir os métodos para bactérias e fungos.

Para amostras virais, não é necessário pré-tratamento.

6. Fezes

IMPORTANTE: Realize os procedimentos o mais rápido possível após a coleta.

- Remoção de impurezas: Para extração de DNA usar 0,5 g de fezes; para extração de RNA usar 0,2 g de fezes. Remover resíduos macroscópicos de alimentos não digeridos. Adicionar PBS pré-resfriado (10 mL/g de fezes), vortexar para misturar bem, centrifugar a 8000g por 10 minutos a 4°C e coletar o sobrenadante para processamento subsequente.
- Tratamento de homogeneização:
Para extração de DNA: adicionar Proteinase K (20 µL) e RNase A (20 µL), incubar a 65°C por 30 minutos.
Para extração de RNA: trabalhar rapidamente em gelo e adicionar β-mercaptoetanol (0,1%) para inibir RNase.

7. Escarro

- Tratamento de liquefação: Adicionar 2 mL de agente liquefator (0,1 M DTT ou 0,5% N-acetilcisteína) a 2 mL de escarro, vortexar por 30 minutos até que o muco se torne transparente.
- Remoção de impurezas: Centrifugar a 12.000 g por 10 minutos, descartar o sobrenadante e ressuspender com 1 mL de PBS, depois centrifugar novamente a 12.000 g por 10 minutos, descartar o sobrenadante e prosseguir com o processo de extração.

8. Urina

- Concentração por centrifugação: Coletar 50 mL de urina. Centrifugar a 3.000g por 15 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante. Ressuspender o precipitado com 1 mL de PBS pré-resfriado (contendo 0,1% de Tween-20 ou Triton 100X), vortexar por 1 min. Colete 1 mL do material vortexado e adicione 100 µL de Proteinase K 20 mg/ml e 4M isotiocianato de guanidina (opcional), incube a 56°C por 15 minutos (para amostras de difícil lise, o tempo de incubação pode ser estendido para 30 minutos). Usar 300 µL da amostra e prosseguir imediatamente com o processo de extração.

9. Saliva

- Remoção de impurezas por centrifugação: Coletar 2 mL de saliva. Adicione 1 mL de PBS pré-resfriado (contendo 0,1% de Tween-20).
- Centrifugar a 3.000g por 10 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante. Adicione 1 mL de PBS pré-resfriado (contendo 0,1% de Tween-20) e 100 µL de Proteinase K 20 mg/ml e 4M isotiocianato de guanidina (opcional), incube a 56°C por 15 minutos (para amostras de difícil lise, o tempo de incubação pode ser estendido para 30 minutos). Usar 300 µL da amostra e prosseguir imediatamente com o processo de extração.

10. Plasma / Soro

- Em caso de sangue total, centrifugue o sangue a 2.500g por 10 minutos. Colete 1 mL de plasma/soro em suspensão.
- Para a maioria das amostras de plasma/soro não é necessário pré-tratamento. Para amostras desafiadoras adicione 500 µl de PBS pré-resfriado (contendo 0,1% de Tween-20 ou Triton 100X), homogenise delicadamente, incube a 37°C por 15 minutos. Usar 300 µL da amostra e prosseguir imediatamente com o processo de extração.

11. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

- Para patógenos no LCR (como bactérias ou vírus): Coletar 400 µL de LCR, centrifugar a 3.000g por 15 minutos, descartar o sobrenadante e coletar 300 µL do precipitado, ressuspender (PBS ou solução salina) e utilizar no processo de extração.
- Para ácidos nucleicos livres no LCR (como DNA ou RNA extracelular):
Se amostra estiver visivelmente hemática: centrifugar a 3.000g por 5 minutos e coletar o sobrenadante.
Se não houver sangue visível: centrifugar diretamente a 12.000g por 1 minuto e coletar o sobrenadante para uso imediato no processo de extração.

12. Amostras de Fluido Corporal: Lavado Broncoalveolar (BALF) e Derrames (Pleural / Ascítico / Pericárdico)

- Centrifugar pelo menos 5 mL da amostra a 4°C por 10 minutos a 3.000g. Descartar o sobrenadante.
- Ressuspender o precipitado com 1 mL de PBS pré-resfriado (contendo 0,1% de Tween-20 ou Triton 100X), vortexar por 1 min. Colete 1 mL do material vortexado e adicione 100 µl de Proteinase K 0,1 mg/ml. Proteinase K até atingir a concentração final de 100 µg/mL e vortexar por 10 segundos. Incubar a 56°C com agitação a 800 g por 30 minutos. Em seguida, aquecer a 95°C por 10 minutos para inativar a Proteinase K. Deixar esfriar à temperatura ambiente por 5 minutos antes de prosseguir com a extração de ácidos nucleicos.

13. Amostras de Tecido / Biópsias (Músculo ou Órgãos)

- Homogeneização mecânica: Coletar 30 mg de tecido com nitrogênio líquido pré-resfriado, adicionar 0,3 mL de tampão de lise (composição: 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 10% SDS, pH 8,0).
Nota: Para extração de DNA, pode-se adicionar Proteinase K até atingir concentração final de 100 µg/mL.
- Para extração de RNA, recomenda-se adicionar 5% (v/v) de β-mercaptoetanol.

14. Materiais Citológicos (Cultura Celular – sobrenadante ou Células Precipitadas)

- Coletar 3 mL de sobrenadante de cultura e centrifugar a 10.000g por 10 minutos a 4°C. Descarte o sobrenadante. Ressuspender o pellet celular em 300 µL de PBS pré-resfriado, centrifugar a 3000g por 5 minutos (repetir duas vezes para remover completamente o

meio de cultura), descartar o sobrenadante e manter o agrupamento celular em 300 µL de PBS, prosseguindo imediatamente para o processo de extração.

15. Raspados de Células Epiteliais (ex.: Raspado Cervical), Swab oral / Swab nasofaríngeo.

- Mergulhar a cabeça do swab de raspado em um tubo de centrífuga contendo 1-3 mL de solução de preservação (PBS e girar o cabo do swab 10 vezes para garantir a liberação total das células. Vortexar por 1 minuto.
- Centrifugar a 3.000g por 10 minutos, descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 300 µL de PBS, prosseguindo imediatamente para o processo de extração.

16. Raspados de Superfície

- Mergulhar a ponta do swab em um tubo de centrífuga contendo 0,5–2 mL de PBS (com 0,1% de Tween-20 ou Triton), girar vigorosamente o cabo do swab 10 vezes para liberar o material adsorvido. Descartar o swab e manter a suspensão.
- Centrifugar a 12.000g por 2 minutos para remover resíduos particulados grandes e coletar 300 µL do sobrenadante. Prosseguir imediatamente com o processo de extração.

17. Helmintos / Protozoários

Volume da amostra: Um verme ou 10^3 – 10^5 protozoários.

NOTA: Se a amostra estiver preservada em etanol 70%, lavar três vezes com PBS estéril para remover o etanol.

Atenção: Todos os procedimentos devem ser realizados em cabine de biossegurança para evitar difusão de aerossóis!

- **Disrupção mecânica:** Congelar rapidamente o verme ou os protozoários (10^3 – 10^5) em nitrogênio líquido por 5 minutos ou freezer -80 por 15 minutos. Faça dois ciclos de choque térmico: Freezer -80 por 15 minutos, seguido de incubação por 10 minutos a 95°C.
- **Leishmania:** Colete 50 mL de cultura líquida de Leishmania, centrifugue a 3.000g por 10 minutos. Despreze o sobrenadante e ressuspender em PBS. Faça dois ciclos de choque térmico: Freezer -80 por 15 minutos, seguido de incubação por 10 minutos a 95°C.

Digestão com Proteinase K (≥ 24 horas): Transferir a amostra mecanicamente rompida para o tampão de lise (proporção volumétrica 1:10), (Tampão de lise: 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA, 1% SDS, Proteinase K em concentração 20 mg/mL). Incubar a 37°C por 24 horas. Usar 300 µL da amostra e prosseguir imediatamente com o processo de extração.

- **Para vermes grandes:** Colocar o verme em um almofariz pré-resfriado com nitrogênio líquido, congelar rapidamente e triturar até virar pó. Digestão com Proteinase K (≥ 24 horas): Transferir a amostra mecanicamente rompida para o tampão de lise (proporção volumétrica 1:10), (Tampão de lise: 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA, 1% SDS, Proteinase K em concentração final de 0,5 mg/mL). Incubar a 56°C por 24–48 horas. Usar 300 µL da amostra e prosseguir imediatamente com o processo de extração.

III. PERGUNTAS FREQUENTES

Problema	Possíveis causas	Opiniões e sugestões
Ímãs magnéticos permanecem no eluente	Diferença na força magnética do equipamento	Transfira o eluente para um tubo de centrifuga de 1,5 mL e separe as esferas magnéticas usando um suporte magnético. Reduza a concentração da amostra original.
Aglomerção das esferas magnéticas	A matriz da amostra interfere nas esferas magnéticas	Faça o pré-tratamento das amostras.
Baixo rendimento da extração	Baixo teor do ácido nucleico alvo na amostra. Dificuldade na lise da amostra.	Realize o pré-tratamento da amostra e, se necessário, aumente o tempo de incubação.
	O kit de extração de DNA & RNA não foi utilizado corretamente.	Certifique-se de usar o programa correto de execução.
	O método utilizado para quantificação do produto extraído pode não ser adequado.	Garanta que métodos quantitativos apropriados estejam sendo adotados.
Degradação de DNA/RNA	Armazenamento inadequado da amostra	Armazene as amostras em condições apropriadas. Evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.
	A amostra é sensível ao pré-tratamento	Assegure-se de usar o método correto de pré-processamento. Reduza adequadamente o tempo de incubação.
Falha na amplificação	Podem existir inibidores de PCR	Confirme a concentração do produto extraído por eletroforese em gel de agarose ou espectrofotometria. Dilua o eluente com água tratada com DEPC e repita a detecção por PCR. Se a amplificação ainda falhar, otimize as condições do PCR, como ajustar a sequência e concentração dos primers, o tipo e concentração de enzimas, ou a temperatura e tempo de anelamento.