

## ANEXOS

### A) PCR convencional

Reagente	Concentração estoque	Concentração final	Volume/ reação (µL)	Volume/ mix (x 11)
Água	-	-		
Tampão	10 X	1 X		
dNTPs	10 mM	0,2 mM		
*Primer F	10 µM	0,2 µM		
*Primer R	10 µM	0,2 µM		
Taq DNA Polimerase	5 U/µL	1,25 U/reação		
**DNA genômico	100 ng/µL	50 ng/reação		-
			Total: 25,0 µL	

**\*Primers (pares por grupo):**

**Grupo 1:** S4 e S12 – PCR família-específica – Trypanosomatidae;

**Grupo 2:** S17 e S18 – PCR gênero-específica – *Leishmania* spp.;

**Grupo 3:** ISVC e ISVB – PCR espécie-específica – *Leishmania (Viannia) braziliensis*;

**Grupo 4:** ISVC e ISVNB – PCR subgênero-específica – *Leishmania (Viannia) não-braziliensis*;

**Grupo 5:** GAPD2-F e GAPD2-R – PCR hospedeiro-específica – Mamíferos;

**Todos os grupos:** hsp70C-F e hsp70C-R – Produtos de PCR a serem utilizados no ensaio de RFLP.

**\*\*Amostras (para todos os grupos e reações):**

- 1) *Leishmania (Leishmania) infantum*
- 2) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- 3) *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- 4) *Leishmania (Viannia) shawi*
- 5) *Crithidia fasciculata*
- 6) *Homo sapiens*
- 7) Amostra-problema X

- 8) Amostra-problema Y
- 9) Amostra-problema Z
- 10) Controle negativo

**Termociclagem:**

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Passo</b>
95°C	3 min	1	Desnaturação inicial
95°C	30 s	40	Desnaturação
60°C (ou 66°C para <i>g6pd</i> )	30 s		Associação
72°C	30 s		Extensão
72°C	10 min	1	Extensão final
18°C	∞	1	Armazenamento

### B) Digestão de DNA para análise de RFLP

Reagente	Concentração estoque	Concentração final	Volume/ reação ( $\mu\text{L}$ )	Volume/ mix (x 11)
Água	-	-		
Tampão	10 X	1 X		
Enzima <i>HaeIII</i>	10 U/ $\mu\text{L}$	7,5 U/reação		
*Produtos da PCR hsp70C	-	-	10,0	-
			Total: 15,0 $\mu\text{L}$	

#### Condições da digestão:

Incubação de 2 horas a 37°C.

### C) PCR em tempo real + HRM

Reagente	Concentração estoque	Concentração final	Volume/ reação (µL)	Volume/ mix (x 22)
Água	-	-		
MeltDoctor HRM Mix	2 X	1 X		
Primer hsp70-F2	10 µM	0,3 µM		
Primer hsp70C-R	10 µM	0,3 µM		
*DNA genômico	100 ng/µL	50 ng/reação		-
			Total: 20,0 µL	

**\*Amostras (em duplicata):**

- 1) *Leishmania (Leishmania) infantum*
- 2) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
- 3) *Leishmania (Viannia) braziliensis*
- 4) *Leishmania (Viannia) shawi*
- 5) *Crithidia fasciculata*
- 6) *Homo sapiens*
- 7) Amostra-problema X
- 8) Amostra-problema Y
- 9) Amostra-problema Z
- 10) Controle negativo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D		1 - L. infantum U hsp70-amp1	1 - L. infantum U hsp70-amp1	2 - L. amazonensis U hsp70-amp1	2 - L. amazonensis U hsp70-amp1	3 - L. braziliensis U hsp70-amp1	3 - L. braziliensis U hsp70-amp1	4 - L. shawi U hsp70-amp1	4 - L. shawi U hsp70-amp1	5 - C. fasciculata U hsp70-amp1	5 - C. fasciculata U hsp70-amp1		
E		6 - H. sapiens U hsp70-amp1	6 - H. sapiens U hsp70-amp1	7 - Amostra X U hsp70-amp1	7 - Amostra X U hsp70-amp1	8 - Amostra Y U hsp70-amp1	8 - Amostra Y U hsp70-amp1	9 - Amostra Z U hsp70-amp1	9 - Amostra Z U hsp70-amp1	10 - Ctrl negativo N hsp70-amp1	10 - Ctrl negativo N hsp70-amp1		
F													
G													
H													

Disposição das amostras na placa 96 poços de PCR.

**Termociclagem:**

