

AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO NA RECUPERAÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS DE HA_{AdV}-5

¹Grazielle Pressi; ²Caroline Rigotto

¹ Bolsista PROBIC Fapergs do Laboratório de Microbiologia Molecular/ Universidade Feevale

² Professora docente da Universidade Feevale e orientadora da pesquisa

Laboratório de Microbiologia Molecular – ERS 239, 2755 | Novo Hamburgo,RS | CEP 93525-075 | E-mail: grazipressi@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A etapa de extração de genomas virais é um dos fatores a ser considerado na recuperação dessas partículas, uma vez que perdas de ácidos nucleicos ocorrem durante a execução deste processo, induzindo a uma subestimação da concentração viral presente na amostra. Para isto, diversos protocolos são descritos, destacando-se os que utilizam colunas de sílica, tendo em vista que estes proporcionam a obtenção de material genômico com elevado grau de pureza. Estudos recentes demonstram que etapas adicionais à extração com kit padrão auxiliam em uma maior eficiência de recuperação viral, sendo estas ebulição e tratamentos prolongados com proteinase K anteriormente ao uso do kit.

OBJETIVO

Avaliar a eficiência de protocolos distintos de extração de suspensões de HA_{AdV}-5, visando a elaboração de técnicas capazes de extrair e recuperar ácidos nucleicos virais com maior efetividade.

METODOLOGIA

Suspensões de HA_{AdV}-5 (com título de $2,20 \times 10^8$ cg/5 μ L) foram submetidas a quatro protocolos distintos de extração:

1º) Amostras diluídas em tampão AE e extraídas com o uso do kit comercial BioPur®;



2º) Amostras diluídas em tampão AE, fervidas por 10 minutos a 100°C, alocadas gelo e, logo após, acrescentados 5 μ L de Proteinase K (BioPur®) e inseridas por uma hora em termobloco a 37°C;

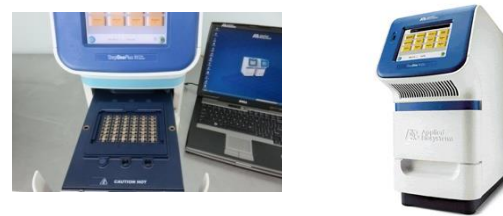


3º) Condição 2, seguido de extração padrão com o uso do kit BioPur®;



4º) Extração com kit BioPur® não empregando a etapa da diluição em tampão AE;

As amostras foram submetidas à qPCR empregando iniciadores que amplificam parcialmente a região da proteína de capsídeo hexon (Wolf et al. 2010).



RESULTADOS

As concentrações médias obtidas para cada condição através de experimentos em triplicata foram:

- 1º) $1,99 \times 10^7$ cg/5 μ L
- 2º) 0 cg/5 μ L
- 3º) $6,13 \times 10^6$ cg/5 μ L
- 4º) $4,18 \times 10^7$ cg/5 μ L

CONCLUSÃO

- No 2º protocolo não foi possível quantificar o DNA viral, sendo que a ebulição de amostras aplicada também ao 3º protocolo não foi eficiente para a extração do genoma de HA_{AdV}-5, pois os valores de quantificação obtidos foram inferiores aos outros protocolos testados.
- Amostras submetidas ao 4º protocolo foram as que apresentaram os valores mais elevados na quantificação do DNA viral através da qPCR.

REFERÊNCIAS

- WOLF S; HEWITT J; GREENING GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, p. 1388-1394. 2010.
- MCMINN, Brian R; GRIMM, Ann C. Optimization and evaluation of a method to detect adenoviruses in river water.
- BERTRAND I. et al. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review.
- FLORES, Eduardo Furtado. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, Ed. UFSM, p. 415-420. 2007.