

PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE DETECÇÃO MOLECULAR DE ADENOVÍRUS PARA USO EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Joseane Vanessa dos Santos da Silva¹, Raquel Frezza¹, Juliana Comerlato¹, Bianca Bergamaschi¹, Andréia Dalla Vecchia¹, Lucas Kessler de Oliveira¹ e Fernando Rosado Spilki (orient.)¹

¹Centro Universitário FEEVALE; joseanesilva@feevale.br; fernandors@feevale.br.

Dentre os vírus entéricos, aqueles excretados pelas fezes, os Adenovírus (ADV), vírus não-envelopados, icosaédricos, com genoma de DNA de fita dupla, podem constituir um organismo indicador na detecção de poluição fecal da água, em auxílio aos protocolos tradicionais utilizando coliformes fecais. No presente estudo, foi desenvolvida uma reação em cadeia da polimerase (PCR) sensível e de fácil execução, que permite a detecção de adenovírus provenientes tanto de aves quanto de mamíferos e que futuramente poderá ser utilizada para detecção de fragmentos genômicos de ADV em amostras de água. Fazendo o uso de análises bioinformáticas, foram desenhados oligonucleotídeos com potencial alinhamento em regiões altamente conservadas do genoma de adenovírus, especificamente no gene que codifica para a proteína do hexon. As análises foram feitas com base em 400 sequências de aviadenovírus e mastadenovírus disponíveis no GenBank e os oligonucleotídeos resultantes foram denominados ADV-F1 (5'-CAGTGGTTCGTACATGCACAT-3') e ADV-R1 (5'-TCGGTGGTGACGTCGTGG-3'), que amplificam em torno de 130 pb do fragmento genômico alvo. Para a padronização da técnica foram utilizadas amostras padrão de Adenovírus aviário EDS-76, Adenovírus bovino (BAV) e Adenovírus Canino tipo 2 (CAV-2). O título viral do BAV foi determinado pela técnica de titulação em microplaca, para posterior análise da sensibilidade da técnica. A sensibilidade analítica foi determinada pela diluição seriada do vírus em base 10 e comparação com os resultados da titulação do BAV em microplaca. A reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificou o DNA alvo de todos os vírus testados, sendo os amplicons de 130pb, conforme esperado. Quanto à sensibilidade analítica, observou-se que o protocolo padronizado é capaz de detectar fragmentos genômicos alvos no limiar de uma partícula viral presente na amostra, tendo em vista que em uma suspensão viral cuja carga viral inicial era de $10^{3.5}$ DICC₅₀/50uL (Doses infecciosas para 50% dos cultivos celulares/ 50uL), conforme ensaio de titulação realizado, detectou-se o DNA em uma diluição de 10^{-4} da suspensão viral. No presente momento estamos testando tal técnica frente a amostras de água experimentalmente contaminadas, procurando validar a técnica padronizada para posterior uso em amostras de campo.

(Apoio: Centro Universitário FEEVALE/CNPq/CAPES)