

## DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE DETECÇÃO MOLECULAR DE ENTEROVÍRUS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

Juliana Comerlato<sup>1</sup>, Raquel Beiersdorf Frezza<sup>1</sup>, Joseane Vanessa dos Santos da Silva<sup>1</sup>, Andréia Dalla Vecchia<sup>1</sup>, Bianca Bergamaschi<sup>1</sup>, Manoela Tressoldi Rodrigues<sup>1</sup>, Michele Regina Vetter<sup>1</sup>, Julio Cesar Maciel<sup>1</sup>, Lucas Kessler de Oliveira<sup>1</sup>, Martha Trindade Oliveira<sup>2</sup>, Ana Cláudia Franco<sup>2</sup>, Paulo Michel Roehé<sup>2</sup> e Fernando Rosado Spilki<sup>1</sup> (orient.)

<sup>1</sup>Centro Universitário FEEVALE; <sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul; juli@feevale.br; fernandors@feevale.br.

Atualmente o controle de poluição fecal em águas destinadas ao consumo humano é baseado na detecção de coliformes fecais. Porém a ausência destes coliformes não exclui a presença de vírus de excreção fecal na água. Dentro dos vírus entéricos destaca-se com importância o enterovírus, considerado o segundo causador de resfriados, e muito associado com gastroenterites, especialmente em crianças. Sabendo da importância epidemiológica deste agente e de um monitoramento ideal da poluição fecal na água, a utilização do enterovírus como bioindicador de poluição fecal seria de grande importância para avaliarmos a credibilidade dos métodos atuais de controle da água. Como ferramenta para detecção e isolamento viral os métodos moleculares, como a PCR, tem se destacado. Assim este estudo se deteve à padronização de uma reação de PCR, utilizando como controle positivo o enterovírus bovino (BEV). Inicialmente este vírus foi cultivado e quantificado por titulação em microplaca. Para extração de ácidos nucleicos virais foi utilizado o kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche). Devido ao fato do enterovírus apresentar RNA houve a necessidade de realizar a RT-PCR. O cDNA foi transcrito com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). O DNA obtido foi usado como molde para a amplificação por PCR. A reação de PCR foi realizada utilizando o *GoTaq Green Master Mix* (Promega). Os iniciadores utilizados foram ENT-F1 (5'-CCTCGGCCCTGAATG-3') e ENT-R2 (5'-ACACGGACACCCAAAGTA-3'). Após a reação, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose e em tampão TBE, com brometo de etídeo, e após visualizado sob luz ultravioleta. Dentro das tentativas de padronizar esta PCR, utilizamos a tecnologia de PCR em gradiente. Depois de padronizada a reação, foi avaliada sua sensibilidade para determinar o limiar de detecção. A reação padronizada obteve excelente sensibilidade analítica, tendo o mínimo de uma partícula infecciosa como limiar de detecção. Com aprimoramentos futuros, tal metodologia poderá ser empregada na detecção de vírus em amostras de água e esgoto, passo de validação que está sendo realizado no presente momento.

(Apoio: Feevale/ IEL/ CNPq/ Virotec Consultoria Veterinária Ltda.)