

EXTRAÇÃO DE RNA DE ROTAVÍRUS A PARTIR DE FEZES DE SUÍNOS

ANA PAULA V. ARGUS¹, TAIANY K. FREITAS², JEAN C. DESCHAMPS², ANDRÉ L. F. SOUZA³,
MARLISE P. CLAUS³

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária do IFC campus Araquari -
ana.argusveiga@gmail.com; ² Médica (o) Veterinária (o); ³ Docente do Curso de Medicina
Veterinária do IFC campus Araquari

ÁREA: (X) Pesquisa; () Extensão **NÍVEL:** () Ensino Médio; (X) Ensino Superior
EDITAL 045/2012 – IFC Araquari

RESUMO

O Rotavírus é um gênero de vírus RNA da família *Reoviridae*. É um agente entérico amplamente disseminado e responsável por causar diarreias graves em humanos e animais. As diarreias em animais representam uma das principais causas de mortalidade no período neonatal e acarreta graves prejuízos na exploração econômica de animais de produção. O genoma do rotavírus é composto por 11 segmentos de RNA dupla fita, que codificam seis proteínas estruturais e cinco não estruturais. O principal modo de transmissão do rotavírus é fecal-oral, com diagnóstico feito por detecção de antígenos em amostra de fezes. O presente trabalho teve como objetivo apresentar e discutir os passos da utilização da técnica de extração de RNA com as técnicas de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica para identificar a presença de rotavírus A, em fezes de leitões de duas a quatro semanas. As amostras fecais foram submetidas ao procedimento de extração de RNA e posteriormente à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Todas as amostras foram negativas para a presença de rotavírus A. A importância da realização do diagnóstico dos agentes etiológicos das diarreias neonatais diz respeito não só às granjas de ensino e aprendizagem como também a todas as granjas de suinocultura comercial, possibilitando uma intervenção do médico veterinário na ocorrência de surtos e na implementação de medidas profiláticas.

Palavras-Chave: Rotavirose suína; Diarreias neonatais em suínos; PAGE.

INTRODUÇÃO

As técnicas moleculares vêm permitindo a identificação de diferentes agentes patogênicos responsáveis por prejuízos tanto na produção animal, como na indústria de alimentos. Nesse contexto, o gênero Rotavírus (Família *Reoviridae*), é considerado em todo o mundo como um dos principais vírus entéricos (ICTV, 2014). Os rotavírus estão amplamente disseminados na natureza, possuindo uma gama de hospedeiros susceptíveis e sendo predominantemente espécie-específicos, porém infecções heterólogas também são relatadas com frequência (LINARES *et al.*, 2009).

O rotavírus caracteriza-se por ser um dos importantes agentes causadores do complexo “diarreia neonatal bovina e suína”, vista como o principal problema sanitário das primeiras fases de criação (ALFIERI *et al.*, 1991). Neste sentido, a confirmação da presença de rotavírus em espécies animais pode auxiliar para que medidas de controle e profilaxia sejam tomadas.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi utilizar e discutir a técnica de extração para obtenção de RNA de rotavírus A em amostras de fezes de suínos.

MATERIAL E MÉTODOS

A Unidade de Ensino e Aprendizagem (UEA) - Suinocultura do IFC-Araquari compreende o alojamento de 22 animais em reprodução, sendo 20 matrizes e dois cachorros. Por uma mudança na programação do manejo reprodutivo da unidade, diminuiu-se o número de coberturas e, conseqüentemente, o número de partos e amostras disponíveis para análise, não confirmando a previsão de nascimento de 30 a 40 leitões por mês. Por essa razão, decidiu-se coletar amostras de duas propriedades localizadas em São Francisco do Sul-SC.

A realização das coletas compreendeu o período de abril de 2013 a maio de 2014. Foram colhidas 58 amostras de fezes de leitões lactentes com uma a quatro semanas de idade. As coletas foram realizadas de animais apresentando ou não quadro de diarreia, resultando em dois grupos de amostras: fezes diarreicas e fezes de consistência normal.

A coleta de amostras biológicas dos leitões foi obtida imediatamente após a defecação, desprezando a porção das fezes que tinham contato com o chão. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, em caixa de isopor e gelo, sendo encaminhadas ao laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Ensino e Diagnóstico Veterinário (LEDVET) para o processamento.

A partir de uma suspensão fecal a 20% (p/v) as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 15 min a 4°C. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram tratadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) e incubadas por 30 min a 56°C. A extração do ácido nucleico foi realizada pela associação das técnicas do fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) descrita por (SAMBROOK & RUSSEL, 2002), e da sílica/isotiocianato de guanidina (BOOM *et al.*, 1990), com modificações descritas por (ALFIERI *et al.*, 2006). O RNA foi eluído em 50 µL de água ultra-pura estéril, tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (*Invitrogen Life Technologies*, EUA) e utilizado para PAGE (HERRING *et al.*, 1982).

Em todos os procedimentos de extração foram incluídos controles da reação. O controle positivo utilizado foi a estirpe OSU amplificada em células MA-104, cedido pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina. Para o controle negativo, foi utilizado uma alíquota de água ultra-pura estéril.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na técnica PAGE, todas as amostras foram consideradas negativas para rotavírus A. Entretanto, o objetivo foi apresentar e discutir os passos da utilização da técnica de extração de RNA, utilizando como parâmetro a extração do RNA genômico de rotavírus A em amostras biológicas com maior possibilidade de ocorrência do agente.

O processo de extração do material genético é constituído de duas etapas: o preparo da suspensão fecal (10 a 20% p/v) e a extração propriamente dita. Essa etapa é de fundamental importância e tem basicamente as funções de purificação e concentração da agente infeccioso com seu respectivo material genético.

O preparo da suspensão fecal iniciou pelo acondicionamento de 100 mg de fezes em um microtubo, seguido pela adição de Tampão Estabilizador de rotavírus (TERV- Tris-Cálcio pH 7,2). Esta suspensão foi homogeneizada e clarificada a baixa centrifugação, utilizando-se 500

μL do sobrenadante para a extração. Esse procedimento serve para concentrar o vírus que permanece em suspensão no sobrenadante.

A extração iniciou com a adição de uma solução de SDS 10% ao sobrenadante recolhido. Esta mistura foi então homogeneizada e incubada em banho-maria a 56°C por 20 minutos, seguido por uma rápida centrifugação. Em seguida foi adicionada uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), seguido de agitação vigorosa, incubação dos microtubos em banho-maria a 56°C por mais 15 minutos, seguido de centrifugação. A mistura fenol/clorofórmio atua na desnaturação e coagulação de proteínas contidas na amostra, e o álcool isoamílico evita a formação de espuma durante a agitação.

Na sequência utiliza-se o protocolo de (BOOM *et al.*, 1990), iniciado pela adição de solução L6 (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,4, isotiocianato de guanidina, EDTA 0,2 mol/LpH 8,0 e TritonX-100) ao sobrenadante recolhido na etapa anterior, seguido pela adição de sílica hidratada. Esta solução auxilia na extração do ácido nucleico, deixando o meio com pH ideal para manutenção das moléculas de RNA e eliminando resíduos interferentes. Nessa etapa os microtubos foram agitados em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para adsorção do ácido nucleico na superfície da sílica, e o sobrenadante descartado.

O procedimento segue com a adição de solução L2 (Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 6,4 e isotiocianato de guanidina), homogeneização, centrifugação rápida e descarte do sobrenadante, por repetidas vezes. Posteriormente, *pellets* contendo o ácido nucleico foram lavados com etanol 70% (v/v) para retirar os resíduos, seguido por centrifugação, descarte do sobrenadante e uma lavagem final com acetona para remoção de qualquer resíduo anterior. Os ácidos nucleicos não são solúveis nestes solventes, precipitando em meio alcoólico.

Posteriormente, seca-se o sedimento de sílica onde ficaram aderidas as moléculas de RNA em banho-maria ou banho seco a 56°C por aproximadamente 15 minutos. Após, adiciona-se água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), seguido por incubação a 56°C por 15 minutos em banho-maria para eluição do ácido nucleico adsorvido na sílica. O DEPC é utilizado para inativação de RNase por provocar modificações covalentes em resíduos de lisina, cisteína, tirosina e, principalmente, histidina, resíduo essencial no mecanismo de reação da RNase (WOLF *et al.*, 1970).

Para finalizar o procedimento de extração, centrifuga-se o microtubo e o sobrenadante (ácido nucleico) é removido e armazenado em outro microtubo e mantido sob refrigeração para utilização posterior em ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR).

As vidrarias e os materiais de plásticos utilizados durante o experimento foram tratados com DEPC 0,1% (v/v), foram lavados com água previamente tratada e esterilizados, em seguida 20 minutos na autoclave, a 121°C para o DEPC ser decomposto em CO₂ e etanol.

Luvas foram utilizadas durante todos os procedimentos, e quando era necessário tocar em superfícies ou materiais que não tinham sido tratados com DEPC eram trocadas às luvas.

Com a extração do RNA propriamente dita, é realizada a técnica de PAGE 7,5%, seguida por coloração pela prata (HERRING *et al.*, 1982). A técnica de PAGE é utilizada, pois possibilita a análise do perfil eletroforético dos 11 segmentos genômicos do vírus, sendo uma técnica bastante utilizada para o diagnóstico do rotavírus grupo A (KANG *et al.*, 2005). O volume contido no microtubo é recolhido com o auxílio de uma pipeta e aplicado no gel. Por meio de uma corrente elétrica, do pólo negativo ao pólo positivo, os segmentos genômicos de pesos moleculares mais leves migram para a parte inferior, pois correm mais rápido no gel. Os segmentos mais pesados ficaram na parte superior, pois tem dificuldade em migrar no

gel. O processo demora cerca de três horas. Todas as amostras apresentaram resultado negativo, validado com a positividade do controle positivo na técnica.

CONCLUSÕES

Embora todas as amostras de fezes coletadas tenham sido negativas, o protocolo escolhido para os procedimentos de extração apresentou-se como uma boa alternativa para esse fim, visto que foi possível a visualização dos 11 segmentos genômicos do controle positivo.

Em função de problemas com a compra dos materiais de consumo do projeto, apenas os procedimentos de extração e PAGE foram realizados, porém com materiais cedidos pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina. A realização da PCR prevista no projeto original para detecção da proteína VP4 constituinte do capsídeo dos rotavírus ficou impossibilitada, em função de não ter os materiais necessários a serem utilizados nesta técnica.

A extração e purificação de ácidos nucleicos a partir de diferentes amostras representam uma etapa fundamental na análise da estrutura e organização do genoma de organismos em estudo, bem como para o diagnóstico de várias doenças que acometem humanos e animais e representam importantes impactos para a economia e a saúde pública.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; CONTE, L.E.; RESENDE, M. Evidências do envolvimento de rotavírus nas diarreias do pré e pós-desmame dos suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.291-300, 1991.

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v.38, p.521-526, 2006.

BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-van DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleicacids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.

ICTV – International Comittee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2013 Release**. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 01 de maio de 2014.

KANG, G.; KELKAR, S.D.; CHITAMBAR, S.D.; RAY P.; NAIK, T. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. **Journal of Infectious Diseases**, v.192, n.20, p.120-126, 2005.

LINARES, R. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; FERONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A. A. Frequency of Group A Rotavirus in Piglet Stool Samples from Non-Vaccinated Brazilian Pig Herds. **Brazilian Archives of Biology and Tecnology**. v.52 n. special: p.63-68, Nov. 2009.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700p., 2002.

WOLF, B.; LESNAW, J.A.; REICHMANN, M.E.A Mechanism of the Irreversible Inactivation of Bovine Pancreatic Ribonuclease by Diethylpyrocarbonate. **European Journal of Biochemistry**. 13:3, p.519-525, 1970.