

## **Desenvolvimento de Metodologia de Detecção Molecular de Enterovírus em Amostras de Água**

Juliana Comerlato (BITEC-CNPq/IEL), Raquel Beiersdorf Frezza, Joseane Vanessa dos Santos da Silva (BIC-CNPq), Andréia Dalla Vecchia, Bianca Bergamaschi, Manoela Tressoldi Rodrigues, Michele Regina Vetter, Julio Cesar Maciel, Lucas Kessler de Oliveira, Fernando Rosado Spilki (orientador) - [juli@feevale.br](mailto:juli@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. Dentre os 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 nucléicos 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-Cpacity 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.

Palavras-chave: enterovírus, PCR, água.

Apoio: FEEVALE, IEL, CNPq, UFRGS, Virotec Consultoria Veterinária Ltda.