

13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL APÓS A ADIÇÃO DO POLIOVÍRUS ATENUADO COMO CONTROLE INTERNO POSITIVO

**SANTOS, Lucas Moreira do
MOTA, Luisa Dias da
MARTINEZ, Ana Maria Barral de
Lucass1@hotmail.com**

**Evento: Encontro de Pós-Graduação
Área do conhecimento: Biologia Molecular**

Palavras-chave: Vacina Antipólio Oral; Biologia Molecular; Vírus de RNA.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas para extração de ácidos nucleicos são amplamente utilizadas em laboratórios de Biologia Molecular, e tem grande importância na detecção de diferentes agentes virais. Apesar da existência de diferentes kits já padronizados para detecção de vírus DNA e RNA, a extração do RNA é diferenciada frente à extração de DNA, devido a sua fácil degradação. Enquanto a realização de eletroforese é utilizada como controle interno positivo das extrações de DNA, isso não é possível quando se trata de RNA. Desta forma torna-se necessário que cada laboratório padronize uma técnica a ser utilizada como controle interno da reação de extração de RNA, tendo em vista a frequente ocorrência de extrações mal sucedidas. Quando isso ocorre tem-se resultado falso negativo na técnica de PCR, devido à ausência de material extraído. Sendo assim, se faz necessário à utilização de um controle interno positivo para verificar a correta execução da reação, garantir o sucesso na extração de RNA em todas as amostras, bem como a confiabilidade dos resultados, excluindo a possibilidade de PCRs falso negativo. O presente estudo tem por objetivo a padronização da técnica de extração de RNA viral após a adição do *Poliovírus* atenuado, que servirá como controle interno positivo da reação, no laboratório de Biologia Molecular da FURG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A ampliação e refinamento destas técnicas de extração, melhoram o resultado e a segurança do diagnóstico empregado pelas técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia de polimerase (KUNO, 1998).

A extração de RNA é um dos principais métodos de investigação de vírus, contudo, a fácil degradação e contaminação do material genético dificulta o processo de diagnóstico e pesquisa (JOBARTEH et al., 2014). Por isso, o aprimoramento das técnicas de extração de RNA é essencial para a construção de uma metodologia segura para diagnóstico molecular (KIRCHNER et al., 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo de caráter experimental baseia-se na adaptação da técnica descrita pelo kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit*® para a extração de RNA viral. Foram utilizadas 8 amostras coletadas do sangue do cordão umbilical de gestantes que realizaram seu

13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

parto no Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Junior durante o ano de 2013. Após a coleta do sangue as amostras foram centrifugadas para obtenção do plasma. Para a extração de RNA foi seguido o protocolo do kit, com a adição prévia nas amostras de 2 uL da vacina da poliomielite diluída a 10^2 . Após a extração, foi realizado PCR para poliomielite para confirmação da extração de RNA, através da técnica de eletroforese em gel.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Todas as amostras encontraram-se positivas na eletroforese em gel indicando que a extração foi realizada com sucesso e o branco demonstrou que não houve contaminação externa durante a técnica de PCR.

Apesar do sucesso da técnica desenvolvida neste estudo, devemos considerar que a má conservação das amostras pode inviabilizá-las previamente aos testes moleculares devido à degradação do RNA. O mesmo é instável a oscilações de temperatura, devendo permanecer estocado a -70°C . Devido a isso, é extremamente relevante à aplicação da técnica padronizada neste estudo a fim de garantir a eficiência na execução das extrações de RNA, conseqüentemente originando resultados mais fidedignos. A aplicação desta técnica exclui erros na fase analítica dos experimentos que visam detectar microorganismos com genoma de RNA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização da técnica de extração de RNA viral por kit após a adição do vírus da *Poliomielite* atenuado, demonstrou-se uma forma de controle interno positivo eficiente para confirmar a correta execução e o sucesso da técnica. Contudo, a mesma tem suas desvantagens, como a inclusão de um PCR a mais para a poliomielite encarecendo o procedimento, bem como a fácil contaminação do RNA da poliomielite no ambiente de trabalho, o que exige cuidado adicional pelo manipulador. Apesar das limitações, esta técnica mostrou-se uma ótima alternativa na confirmação da correta execução da extração de RNA viral.

REFERÊNCIAS

JOBARTEH, M. L. et al. The effect of delay in collection and processing on RNA integrity in human placenta: experiences from rural Africa. **Placenta**, v. 35, n. 1, p. 72–4, jan. 2014.

KIRCHNER, B. et al. mRNA and microRNA purity and integrity: the key to success in expression profiling. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1160, p. 43–53, jan. 2014.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of virological methods**, v. 72, n. 1, p. 27–41, maio 1998.