

Avanços em Sanidade, Produção e Reprodução de Suínos V

SINSUI 2021 ON-LINE

13º Simpósio Internacional de Suinocultura

Produção, Reprodução e Sanidade Suína

(Anais do XIII SINSUI-Simpósio Internacional de Suinocultura)

Brasil

Porto Alegre, 6 a 8 de julho de 2021

Editores

Fernando Pandolfo Bortolozzo

Ivo Wentz

Ana Paula Gonçalves Mellagi

Rafael da Rosa Ulguim

Karine Ludwig Takeuti

Aline Fernanda Lopes Paschoal

David Emilio Barcellos



Editores: Fernando Pandolfo Bortolozzo, Ivo Wentz, Ana Paula
Gonçalves Mellagi, Rafael da Rosa Ulguim, Karine Ludwig Takeuti
Aline Fernanda Lopes Paschoal e David Emilio Barcellos

S612a Simpósio Internacional de Suinocultura (13. : 2021 : Porto Alegre, RS).
Avanços em sanidade, produção e reprodução de suínos V (Anais do
XIII SINSUI – Simpósio Internacional de Suinocultura), Porto Alegre, julho de
2021 / Editores, Fernando Pandolfo Bortolozzo, Ivo Wentz, Ana Paula
Gonçalves Mellagi, Rafael da Rosa Ulguim, Karine Ludwig Takeuti, Aline
Fernanda Lopes Paschoal, David Emilio Barcellos. – Porto Alegre :
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2021.
109 p.

ISBN 978-65-5973-012-4

1. Suinocultura I. Bortolozzo, Fernando Pandolfo II. Wentz, Ivo
III. Mellagi, Ana Paula Gonçalves IV. Ulguim, Rafael da Rosa V. Takeuti,
Karine Ludwig VI. Paschoal, Aline Fernanda Lopes VII. Barcellos, David
Emilio VIII. Título

CDD 636.4

Catálogo na fonte: Ana Vera Finardi Rodrigues – CRB-10/884

Avaliação de três kits comerciais para extração de RNA de Influenza A em fluido oral de suínos

Lara AC^{*1}, Gava D², Schaefer R², Goslar, MS³, Barcellos DESN¹

¹Departamento de Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - BR; ²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – BR, ³Seara Alimentos, Seara - BR; Autor para correspondência: acvet@gmail.com

Palavras chave: Vírus, detecção, RT-PCR.

Introdução

O vírus influenza A (IAV) é um vírus envelopado, com genoma composto por RNA, segmentado. O IAV é um dos principais patógenos envolvidos em casos de infecção respiratória aguda em suínos, impactando negativamente a produção de suínos (7). O vírus é considerado endêmico na suinocultura mundial e os subtipos H1N1, H1N2 e H3N2 são os mais prevalentes (1, 2, 7). O diagnóstico da influenza em suínos é realizado a partir de amostras de secreção nasal, suabe orofaríngeo, “wipes”, fluido oral e tecido pulmonar, as quais são testadas por RT-PCR (7).

O fluido oral (FO) tem sido utilizado no diagnóstico de influenza em suínos, pois além de ser uma amostra mais representativa do plantel para detectar excreção viral, é rápido, de baixo custo e de fácil amostragem (3, 4). O fluido oral é composto pela secreção das glândulas salivares, misturada com soro, células inflamatórias, fungos, bactérias, vírus, secreções nasais e bronquiais, células epiteliais da mucosa oral e debris de alimentos (2, 5). Muitos destes elementos presentes na saliva influenciam a extração de ácidos nucleicos, degradando o RNA e atuando como inibidores durante a reação de RT-PCR (8).

Existem vários kits disponíveis comercialmente e com alta qualidade para extração de RNA a partir de pequenas quantidades de material biológico, porém estes necessitam ser avaliados para cada matriz que se deseja testar. Neste trabalho, três kits comerciais de extração automatizada de ácidos nucleicos, baseados em “beads magnéticas”, foram avaliados para extração de RNA de IAV em FO de suíno.

Material e métodos

Para a extração de RNA foi utilizada uma amostra de IAV H1N1pdm09 isolada de suínos em 2010 (CMISEA - BRMSA 00099) (6), com TCID₅₀/mL 10^{4,38}. Foi realizada diluição seriada 1:10 do vírus em solução salina fosfatada (PBS) e, em seguida, amostras de FO, negativas para IAV (8), foram acrescidas à diluição viral finalizando as respectivas concentrações (10⁻¹ a 10⁻⁶).

A seguir, RNA viral foi extraído, a partir das diluições 10⁻¹ a 10⁻⁶, utilizando os kits MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (Thermo Fisher), MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher) e MagAttract 96 Cador Pathogen Kit (Qiagen). A proporção utilizada de FO/volume eluído final foi de 50/50uL; 200/90uL e 200/100uL, respectivamente. Após a extração de RNA, foi realizada a amplificação do gene que codifica a proteína da matriz (M) do IAV por meio do teste de RT-qPCR (8). Na reação foi utilizado o kit AgPath-ID OneStep (Ambion), o sistema de detecção TaqMan e o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). O ciclo de quantificação (Cq), inversamente associado à carga viral, foi determinado para cada amostra. Como controle positivo foi utilizada a amostra BRMSA 00099, diluída 1:10 em PBS e, como controle negativo, FO testado por RT-qPCR e negativo para IAV.

Resultados e discussão

RNA de IAV foi extraído de amostras de FO e a RT-qPCR foi realizada conforme descrito acima. Amplificação do gene M do IAV foi detectada para as amostras de FO com RNA extraído com o uso dos kits de extração MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (ThermoFisher) e MagAttract 96 Cador Pathogen Kit (Qiagen) (Tabela 1). Não foi evidenciada amplificação do gene M do IAV quando o RNA viral foi extraído com o uso do MagMAX CORE Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher). Vários estudos reportam o uso do kit MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit

Sanidade

(ThermoFisher) para detecção de IAV em FO (1, 2, 3, 4). Além disto, o MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit requer uma quantidade inicial menor de FO e gera um volume eluído final de RNA na proporção 1:1. Apesar do MagAttract 96 Cador Pathogen Kit (Qiagen) usar um volume inicial maior de FO e gerar um volume eluído de 2:1, o volume final de RNA é maior quando comparado com o MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (ThermoFisher), todavia sem causar prejuízo no ciclo de quantificação (Tabela 1). Yang et al. (9) mencionam, porém que o rendimento e a qualidade dos ácidos nucleicos têm um impacto direto no desempenho do ensaio. Além disso, um maior volume de RNA eluído é importante quando se deseja avaliar a amostra para um número maior de agentes patogênicos e aplicação do RNA para outras técnicas de diagnóstico molecular.

O uso comercial de diagnósticos baseados em amostras de FO aumentou consideravelmente nos últimos anos devido as vantagens práticas, econômicas e de bem-estar relativas à coleta de FO, quando comparado a coleta de sangue. É importante observar que a amostra de FO também pode conter material do sistema respiratório, contaminação ambiental e fecal, material da cavidade nasal e anticorpos, ampliando ainda mais o escopo para a detecção de agentes infecciosos por essa matriz. Por outro lado, este amplo material resulta em alguns desafios para a análise laboratorial, principalmente em relação aos inibidores da PCR e à degradação da amostra. Para minimizar estes impactos, métodos de coleta, processamento e preservação das amostras estão mais refinados, além da otimização de reagentes e etapas da PCR (1, 2, 4).

Conclusão

Os kits de extração MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (ThermoFisher) e MagAttract 96 Cador Pathogen Kit (Qiagen) foram igualmente eficientes na extração de RNA de IAV em amostras de FO de suínos.

Referências

(1) Ciacci-Zanella, J.R.; Schaefer, R.; Gava, D. et al. Influenza A virus infection in Brazilian swine herds following the introduction of pandemic 2009 H1N1. *Veterinary Microbiology*. v.180, p.118-22, 2015. (2) Detmer, S.E.; Patnayak, D.P.; Jiang, Y. et al. Detection of Influenza A virus in porcine oral fluids samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.23, p.241-7, 2011. (3) Gerber, P.F.; Dawson, L.; Strugnell, B. et al. Using oral fluids samples for indirect surveillance in farmed UK pigs. *Veterinary Medicine Science*. v.3, p.3-12, 2016. (4) Hernandez-Garcia, J.; Robben, N.; Magnée, D. et al. The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex. *Porcine Health Management*. v.3, 2017. (5) Humphrey, S.P. & Williamson, R.T. A review of saliva; normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*. v.2, p.162-9, 2001. (6) Nelson, M.; Schaefer, R.; Gava, D. et al. Influenza A viruses of human origin in swine, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. v.8, p.1339-47, 2015. (7) Van Reeth, K. & Vincent, A.L. Influenza viruses. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A. et al. *Diseases of Swine*. 11th, p.576-593, 2019. (8) Zhang, J. & Harmon, K. RNA extraction from swine samples and detection of influenza A virus in swine by real-time RT-PCR. *Methods in Molecular Biology*. v.1161, p.277-293, 2014. (9) Yang, G.; Erdman, D.E.; Kodani, M. et al. Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. *Journal of Virological Methods*. v.171, p.195-9, 2011.

Tabela 1: Resultados de Cq na detecção de IAV em amostras de fluido oral de suínos quando utilizados três kits de extração de RNA.

Amostras	Diluição	MagMAX-96 (ThermoFisher)	MagMAX CORE (ThermoFisher)	MagAttract 96 (Qiagen)
T1	10 ⁻¹ FO	21,45	-	21,45
T2	10 ⁻² FO	25,36	38,23	29,09
T3	10 ⁻³ FO	32,70	-	32,59
T4	10 ⁻⁴ FO	37,46	-	36,80
T5	10 ⁻⁵ FO	-	-	-
T6	10 ⁻⁶ FO	-	-	-
C -	FO	-	-	-
C +	10 ⁻¹ PBS	21,83	21,49	21,19