

# USO DE TRATAMENTO ENZIMÁTICO PARA TESTAR VIABILIDADE DE ADENOVÍRUS PORCINO ISOLADO DE DEJETO SUÍNO

Viancelli, A.<sup>1</sup>; Garcia, L.A.T<sup>1</sup>; Steinmetz, R.L.R<sup>2</sup>; Kunz, A.<sup>2</sup>; Esteves, P.A.<sup>2</sup>; Barardi, C.R.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Virologia Aplicada, UFSC, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brasil;

<sup>2</sup>Embrapa Suínos e Aves, C.P. 21, 89700-000, Concórdia, SC, Brasil

Autor correspondente: [cbarardi@ccb.ufsc.br](mailto:cbarardi@ccb.ufsc.br)

## Resumo

Amostras de dejetos suínos foram coletadas de granja de criação de suínos localizada na EMBRAPA – Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, para a quantificação de adenovírus porcino por qPCR e as amostras positivas foram testadas para viabilidade viral usando ensaio com DNase. Onze eventos amostrais foram realizados entre março de 2009 a maio de 2010. Os resultados de qPCR mostraram uma média de  $8.69E+04$  cópias genômicas (cg) /mL nas amostras coletadas. O tratamento das amostras concentradas com DNase antes da extração de ácidos nucleicos revelou uma média vírus viáveis de  $1.31E+02$  gc/mL. De acordo com os resultados aqui descritos, o tratamento de amostras com DNase pode ser uma ferramenta útil para a verificação de viabilidade viral sem a necessidade de cultura celular.

**Palavras-chave:** adenovírus porcino, DNase, viabilidade viral

## Abstract

Swine manure samples were collected from swine housing located at EMBRAPA - Swine and Poultry, Concórdia, Santa Catarina, to quantify porcine adenovirus by qPCR and positive samples were tested for virus viability using DNase assay. Eleven sampling events were performed from March 2009 to May 2010. The qPCR results showed that the average of genome copies (gc)/mL in the manure collected  $8.69E+04$ . DNase treatment of concentrated samples before nucleic acids extraction showed averages of viable virus of  $1.31E+02$  gc/mL. According to the results here described, DNase treatment of samples can be an useful instrument to check viral viability without cell culture performance.

**Keywords** porcine adenovirus, DNase, viral viability

## INTRODUÇÃO

A produção de suínos mudou dramaticamente nas últimas três décadas, de pequenas propriedades de subsistência a mega empreendimentos de criação de suínos, sendo que o Brasil possui um rebanho de 35 milhões de cabeças, e a produção se concentra principalmente na região sul (IBGE, 2006). Este perfil de produção aumenta o volume de dejetos produzidos e também eleva o consumo de água (Kunz et al., 2009).

A disposição de dejetos diretamente ao ambiente não é recomendada, haja vista o impacto ambiental decorrente das altas cargas de nutrientes (ex: N e P). Além disso, o dejetos suínos pode conter microrganismos patogênicos que podem contaminar o ambiente, animais e seres humanos. Entre os organismos que podem estar presentes em dejetos de suínos destaca-se o adenovírus porcino (PAdV), um vírus da família *Adenoviridae*, icosaédrico não envelopado, com genoma DNA dupla-fita, abundante, altamente prevalente e de longa duração em fezes e urina, águas residuárias e lodo

(Hundesda e col., 2006; Maluquer de Motes e col., 2004), essa ampla distribuição faz do PAdV um excelente marcador de contaminação ambiental.

Atualmente, técnicas moleculares baseadas em DNA, como PCR, são amplamente usadas para detecção de presença viral, nos mais diversos campos de estudo. Embora estas técnicas proporcionem resultados rápidos, sensíveis e específicos, elas não diferenciam partículas virais infecciosas de não infecciosas. No entanto, alguns estudos têm sido conduzidos no delineamento de métodos para detecção apenas de partículas viáveis. Tratamentos enzimáticos podem diferenciar vírus viáveis de não viáveis baseados na capacidade dos capsídeos protéicos protegerem o genoma de proteases e nucleases.

Considerando o descrito acima, o presente estudo descreve a quantificação de genomas de PAdV por qPCR antes e depois do tratamento com a enzima DNase em amostras de dejetos suíno, objetivando quantificar partículas virais viáveis sem o uso de cultura celular animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Amostragem:** Foram analisadas 11 amostras de dejetos provenientes da Estação de Dejetos de Suínos (ETDS) e sistema de lagoas da Unidade Demonstrativa (UD), localizadas na EMBRAPA- Suínos e Aves, Concórdia, Santa Catarina, entre os meses de março de 2009 a maio de 2010. Em cada amostragem foram coletados 20 mL de dejetos suíno.

**Clarificação e concentração viral:** Amostras foram clarificadas usando o método tampão glicina e precipitadas com polietileno glicol, de acordo com Schindwein et al. (2010). Adicionalmente, um passo de centrifugação usando filtros Centriprep<sup>®</sup> YM 50 (Millipore) foi realizado e as amostras foram concentradas em volume final de 2 mL e armazenadas a -80°C até a extração do material genético.

**Extração de material genético:** Extração de ácidos nucleicos foi realizado com kit comercial QIAmp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen) conforme instruções do fabricante.

**Curva padrão para detecção de PAdV:** Curvas padrão foram construídas pela transformação de células *E. coli* DH5 $\alpha$  com plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) contendo uma sequência de 612 pb referentes ao hexon de PAdV-3. O DNA plasmídico foi quantificado usando espectrofotômetro Nanovue (GE Health Care) e diluído de  $10^9$  a  $10^{-1}$  moléculas de DNA por 10  $\mu$ L em TE. Estas amostras foram submetidas a qPCR para PAdV como descrito por Hundesda et al. (2009). As diluições padrão foram estocadas a -80°C em pequenas alíquotas até o uso.

**PCR quantitativo:** PCR quantitativo foi realizado conforme descrito por Hundesda et al. (2009), em um sistema StepOne Plus real-time PCR (Applied Biosystems). Cada amostra foi testada em duplicatas e em cada placa utilizaram-se 4 diluições seriadas de padrões processados em triplicatas. O número de cópias genômicas foi definido como a média dos dados obtidos. Um controle negativo foi adicionado em cada ensaio.

**Curva de DNase:** Para determinar a quantidade de DNase necessária para degradar todo DNA viral livre, uma reação padrão foi estabelecida. Para isso, uma quantidade conhecida de adenovírus humano (HAdV) contendo  $6 \times 10^5$  ffu foi submetido ao método de extração descrito acima, e 1,0  $\mu$ g do DNA extraído foi incubado com 1,0; 0,5; 0,3 ou 0,1 unidades/ $\mu$ L de DNase (Sigma) em um volume final de 20  $\mu$ L na presença de tampão 1x e água livre de nucleases. Uma reação controle foi realizada sem DNase. As reações foram mantidas a temperatura ambiente por 15 min, e a atividade enzimática foi interrompida com EDTA 25 mM seguido de elevação de temperatura a 65 °C por 10 min. qPCR foi realizado conforme item PCR quantitativo.

**Teste de atividade e inibição de DNase:** Para confirmar a habilidade da DNase de degradar todo o DNA viral livre presente na amostra,  $6 \times 10^5$  ffu de HAdV foi inativado por aquecimento a  $95^\circ\text{C}$  por 1 h, seguido de 30 min de exposição a radiação UV e então submetido a degradação com DNase usando a quantidade necessária de enzima para degradar 100% dos genomas. Para testar potenciais inibidores de DNase presentes nas amostras concentradas, uma quantidade conhecida de DNA de HAdV foi adicionado a 170  $\mu\text{L}$  de amostra concentrada (negativa para HAdV) e em água livre de nucleases como controle.

**Teste de viabilidade viral:** Após a padronização do teste de DNase, realizou-se teste de viabilidade viral de todas as amostras que apresentaram resultados positivos para PAdV no qPCR. As reações foram realizadas com 1 U de DNase, tampão 1x e 170  $\mu\text{L}$  de cada amostra concentrada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vírus DNA comumente excretados em fezes ou urina e estáveis no ambiente como o PAdV tem sido apontados como marcadores para estudo de vírus presentes em sistemas de tratamento de dejetos suíno. A ideia deste trabalho foi verificar a eficiência de remoção viral baseada na presença de genomas ligados a testes de viabilidade.

Tradicionalmente a detecção de vírus viável em água usa linhagens celulares nas quais os vírus se propagam e produzem efeito citopático (Dahling, 1991). No entanto, métodos de cultura celular são trabalhosos e algumas vezes difíceis, pois cada vírus tem capacidade diferente de se propagar e alguns não são adaptados em cultura celular (Rodriguez et al., 2009). Recentemente, Nuanalsuwan e Cliver (2003) propuseram o pré-tratamento de amostras usando protease e RNase para diferenciação entre vírus viável e não viável. A hipótese por eles levantada é a de que um capsídeo viral intacto é menos suscetível a degradação por protease do que capsídeos danificados. A mesma ideia tem sido proposta para vírus de genoma DNA (Girones et al., 2010) onde pré-tratamento com DNase é realizado objetivando a degradação de todo o DNA livre, desta forma partículas viáveis protegeriam seu DNA e técnicas moleculares subsequentes detectariam apenas vírus viáveis.

DNA extraído de  $1.03 \times 10^8$  cg foi quantificado e tratado com diferentes quantidades de DNase. Os resultados do qPCR revelaram que para a completa degradação de 1  $\mu\text{g}$  de DNA viral é necessária 1 U de DNase. O teste de inibição mostrou que a matriz amostral não inibiu a atividade da DNase, pois a quantidade de DNA viral degradado na presença de água livre de nuclease e na presença de amostra concentrada foi similar.

Os resultados combinados de qPCR de amostras tratadas e não tratadas com DNase revelaram uma média de  $8.69 \times 10^4$  e  $1.31 \times 10^2$  cg/mL antes e depois do tratamento com DNase, respectivamente, sugerindo que o último valor se refere a genomas provenientes de vírus viáveis na amostra. A quantificação de DNA de PAdV total revelou que 91% das amostras analisadas foram positivas. A aplicação do tratamento com DNase mostrou que entre as amostras positivas, 80% apresentaram partículas viáveis de PAdV.

Os resultados obtidos mostraram que aplicando esta técnica nas amostras aqui descritas, foi possível detectar a presença de partículas viáveis de PAdV nas amostras de dejetos suíno. Isso demonstra a importância do tratamento de dejetos antes da sua disposição no ambiente. Além disso, é importante o estudo da presença de vírus viáveis após o tratamento, para que se tenha segurança no uso do efluente tratado. Estudo recente com adenovírus humano (HAdV), mostrou a presença deste vírus no efluente

final de um sistema de tratamento, enfatizando a alta resistência destes vírus aos atuais métodos de desinfecção (Cardutti et al., 2009).

Além da alta quantidade de cópias genômicas encontradas, há a presença de partículas virais viáveis. Estes resultados são mais importantes do que resultados de presença/ausência, considerando que em algumas vezes o dejetos suíno não recebe tratamento antes de ser utilizado para fins agrícolas. Embora PAdV não cause doenças severas, sua ampla distribuição e prevalência no ambiente é um alerta sobre outros vírus que podem causar sérios problemas econômicos se disseminados no rebanho.

### CONCLUSÃO

Teste de viabilidade usando DNase, mostrou que 80% das amostras positivas apresentaram partículas viáveis de PAdV, sugerindo a importância do tratamento de dejetos suíno antes da disposição no solo. Ademais, de acordo com os resultados aqui descritos, o pré-tratamento de amostras com DNase pode ser um excelente instrumento para verificação de viabilidade viral em amostras sem o uso de cultura celular.

### AGRADECIMENTOS

Este estudo teve o apoio financeiro do CNPq - CT-Hidro nº 22/2009 e EMBRAPA – Macroprograma 2.

### REFERENCIAS

- CARDUCCI, A.; BATTISTINI, R.; ROVINI, E.; VERANI, M. Viral Removal by Wastewater Treatment: Monitoring of Indicators and Pathogens. *Food Environ. Virol.* 1:85–91. 2009.
- DAHLING, D. Detection and enumeration of enteric viruses in cell culture. *Rev. Environ. Contam.* 21:237–263. 1991.
- GIRONES, R., et al. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques, *Water Research. In press.* 2010.
- HUNDESA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N. C.; GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7886–7893. 2006.
- HUNDESA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; ALBINANA-GIMENEZ, N. C.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; BOFILL-MAS, S.; SUÑEN, E.; GIRONES, R. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. *J. Virol. Meth. in press.* 2009.
- IBGE. Sistema de Recuperação Automática de Dados. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. 2006.
- KUNZ, A; STEINMETZ, R; RAMME, M; COLDEBELLA, A. Effect of storage time on swine manure solid separation efficiency by screening. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 1815-1818. 2009.
- MALUQUER DE MOTES, C., CLEMENTE-CASARES, P., HUNDESA, A., MARTIN, M., GIRONES, R. Detection of bovine and porcine adenovirus for tracing the source of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1448–1454. 2004.
- NUANUALSUWAN, S., AND D. O. CLIVER. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 350–357. 2003.
- RODRÍGUEZ, R.A.; PEPPER, I.L; YERBA, C.P. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2): 297–307. 2009.
- SCHLINDWEIN, A. D.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science and Technology*, v. 61, p. 537-544. 2010.