

**Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Núcleo de Medicina Tropical**

Fábio Gonçalves da Silva

**Detecção molecular de vírus gastroentéricos em amostras de fezes
conservadas em formol**

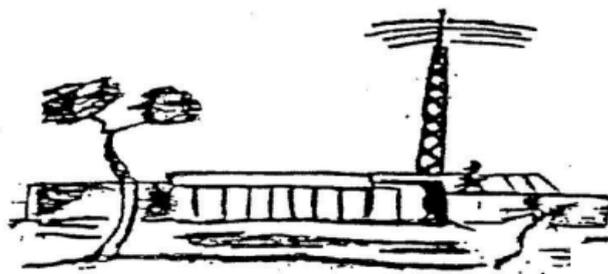
Brasília, 2019

FÁBIO GONÇALVES DA SILVA

**DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS GASTROENTÉRICOS EM
AMOSTRAS DE FEZES CONSERVADAS EM FORMOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador: Prof. PhD. Rodrigo Haddad
Co-orientadora: Profa. Dra. Thaís Alves da Costa Lamounier



BRASÍLIA - DF

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

SV819d Silva, Fábio Gonçalves da
Detecção molecular de vírus gastroentéricos em amostras de fezes conservadas em formol / Fábio Gonçalves da Silva; orientador Rodrigo Haddad; co-orientador Thais Alves da Costa Lamounier. -- Brasília, 2019.
72 p.

Dissertação (Mestrado - Doutorado em Administração) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Formol. 2. Formalina. 3. RNA-Carrier. 4. Vírus gastroentéricos. 5. Extração de ácidos nucleicos. I. Haddad, Rodrigo, orient. II. Lamounier, Thais Alves da Costa, co orient. III. Título.

Dissertação aprovada em: 12 de Julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Haddad (Presidente)

Dr. Svetoslav Nanev Slavov (Membro externo)

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira (Membro não vinculado ao programa)

Prof. Dr. Alex Leite Pereira (Suplente)

Dedico a meu pai, Waldir Pereira da Silva, *in memoriam*.

*“E mesmo sem te ver
Acho até que estou indo bem
Só apareço, por assim dizer
Quando convém aparecer...
...Quero que saibas que me lembro
Queria até que pudesses me ver
És parte ainda do que me faz forte...”*

Legião Urbana - Giz

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de todos e todas as coisas.

À Universidade de Brasília, ao núcleo de Medicina Tropical e a todos os seus docentes pela oportunidade que me foi dada. Agradeço sinceramente ao professor PhD. Rodrigo Haddad por toda confiança depositada e aos ensinamentos.

À minha coorientadora professora Dr. Thaís Alves da Costa Lamounier pela parceria de anos, pela paciência, conselhos, dedicação e presteza sempre que precisei de seu auxílio.

Aos capacitados profissionais técnicos dos laboratórios do Campus de Ceilândia que me auxiliaram ao longo do caminho, em especial Lorena e Elias.

À colega de grupo e de laboratório Tatyane Quintão que tanto me auxiliou nos experimentos ao longo do projeto.

À professora Isabel Cristina Rodrigues da Silva que gentilmente cedeu seu espaço no laboratório e reagentes para que eu pudesse realizar experimentos.

A meus pais que fizeram de mim tudo aquilo que sou hoje, não há como agradecer por tudo que são em minha vida. Aos meus familiares e a Ruana Leite Chaves, minha companheira, pelo apoio e compreensão na reta final dessa caminhada.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram comigo e torceram por esse trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados na PCR para a identificação molecular dos vírus

Tabela 2: Comparação da recuperação do *amplicon* de acordo com a metodologia.

Tabela A1: Dosagem de RNA e DNA após extração por coluna de sílica

Tabela A2: Dosagem de RNA e DNA após extração de 300µL de amostras com formalina.

Tabela A3: Dosagem de produto de PCR com 25ng/µL de DNA como molde

Tabela A4: Dosagem de produto de PCR com 50ng/µL de DNA como molde

Tabela A5: Nível de pureza do produto de extração por coluna de sílica em amostras sem formol e com formol (F).

Tabela A6: Nível de pureza do produto de extração pelos três métodos com formol.

Tabela A7: Nível de pureza do produto de PCR com 25µg/mL.

Tabela A8: Nível de pureza do produto de PCR com 50µg/mL.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Dosagem de RNA e DNA após extração por coluna de sílica.

Gráfico 2: Dosagem de RNA e DNA após extração de 300 μ L de amostras com formalina.

Gráfico 3: Dosagem de produto de PCR com 25 μ g/mL de DNA como molde

Gráfico 4: Dosagem de produto de PCR com 50 μ g/mL de DNA como molde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da partícula viral de um Rotavírus.

Figura 2: Estrutura do genoma do Rotavírus

Figura 3: Estrutura da partícula do Norovírus.

Figura 4: Estrutura do genoma viral do Norovírus

Figura 5: Estrutura do genoma do Sapovírus

Figura 6: Estrutura da partícula viral do Adenovírus

Figura 7: Gel de agarose da primeira rodada de extrações utilizando a coluna de sílica.

Figura 8: Gel de agarose 1,5%, PCR com controles a 25µg/mL

Figura 9: Gel de agarose 1,5%, PCR com controles a 50µg/mL

Figura 10: Fezes frescas adicionadas de controles positivos em seguida de formalina a 10%

LISTA DE ABREVIÇÕES

cDNA: *complementary deoxyribonucleic acid*

CIVD: coagulação intravascular disseminada

DNA: *deoxyribonucleic acid*

dNTP: *deoxyribonucleotide triphosphate*

HAdV: *human Adenovirus*

mRNA: *messenger ribonucleic acid*

NoV: Norovirus

ORF: *open Reading frame*

PCR: *polymerase chain reaction*

pH: potencial Hidrogeniônico

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*

RNA: *ribonucleic acid*

RRV: *reshus Rotavirus*

RSV: *respiratory syncytial virus*

SaV: Sapovirus

tRNA: *transfer ribonucleic acid*

ÍNDICE

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. A GASTROENTERITE.....	17
1.2. BACTÉRIAS E PARASITOS.....	17
1.3. ROTAVÍRUS.....	18
1.4. NOROVÍRUS.....	20
1.5. SAPOVÍRUS.....	24
1.6. ADENOVÍRUS.....	26
1.7. DIAGNÓSTICO DAS GASTROENTERÍTES.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVO.....	34
3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO.....	34
3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. AMOSTRAS.....	35
4.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	35
4.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	36
4.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E GEL DE AGAROSE.....	36
4.5. INOCULAÇÃO DE FEZES FRESCAS COM CONTROLE POSITIVO.....	38
4.6. ASPECTOS ÉTICOS.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1. VERIFICANDO O EFEITO DA FORMALINA SOBRE OS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	39
5.2. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	40
5.3. COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE DNA UTILIZADO COMO TEMPLATE PARA O PCR - 25µg/mL.....	41
5.4. COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE DNA UTILIZADO COMO TEMPLATE PARA O PCR - 50µg/mL.....	43
5.5. DETECÇÃO DOS VÍRUS EM FEZES.....	46
6. DISCUSSÃO.....	48

7. CONCLUSÃO.....	56
8. ANEXOS	58
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

RESUMO

A gastroenterite aguda é uma manifestação clínica que causa diarreia, vômitos, náusea e, em casos mais severos, desidratação que pode levar, principalmente crianças e idosos, ao óbito. Estimativas apontam que um bilhão e setecentos mil casos de gastroenterite ocorram anualmente em todo o mundo, tal manifestação gera grande prejuízo econômico, seja por dispêndios médicos ou pelo impacto social que gera ao debilitar trabalhadores em idade produtiva. Dentre os agentes causadores dessa moléstia estão os vírus gastroentéricos, especialmente os pertencentes às famílias *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae* e *Adenoviridae*. Para a detecção de vírus gastroentéricos as amostras ideais seriam fezes frescas, diarreicas e sem conservante. Na prática clínica, a obtenção destas amostras representa um percentual muito menor se comparado com as amostras contendo conservantes à base de formol. A formalina é um importante interferente para a utilização de técnicas de detecção molecular, sendo capaz de reduzir a eficiência de pareamento de oligonucleotídeos, fragmentar moléculas de DNA e RNA, dificultar a precipitação de ácidos nucleicos durante o processo de extração e diminuir a capacidade catalítica da *Taq Polimerase*. O primeiro passo para a utilização de técnicas moleculares é a extração do material genético, desse modo, a comparação de diferentes métodos de extração para recuperar ácidos nucleicos virais em amostras de fezes acondicionadas com formalina pode apresentar uma alternativa diagnóstica para vírus de RNA e DNA. Para tal, três metodologias de extração foram comparadas para a detecção de quatro vírus gastroentéricos que são importantes causadores de quadros de gastroenterite utilizando a técnica de PCR. Foi possível demonstrar que a adição de *RNA-Carrier* durante a extração das amostras aumentou a quantidade de material genético recuperado; a concentração de DNA utilizado como *template* para o PCR é um fator importante para uma amplificação bem-sucedida a depender da técnica utilizada; e dentre as

metodologias testadas, uma se mostrou mais eficaz, tem custo mais baixo e pode ser uma importante ferramenta para a utilização de amostras biológicas que tendem a ser descartadas em inquéritos epidemiológicos devido a sua não conformidade pela adição de formol. A não investigação dessas amostras impacta em resultados subestimados de incidência e prevalências desses agentes virais.

PALAVRAS CHAVES: formol, formalina, *RNA-Carrier*, vírus gastroentéricos, extração de ácidos nucleicos.

ABSTRACT

Acute gastroenteritis is a clinical manifestation that causes diarrhea, vomiting, nausea and in more severe cases dehydration that can lead, mainly, children and elderly people to death. Estimates indicate that 1.7 billion cases of gastroenteritis occur annually around the world, this manifestation generates great economic damage, either by medical expenses or by the social impact that it generates by debilitating workers on productive age. Among the agents that cause this disease are the viruses, especially those belonging to the families *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae* and *Adenoviridae*. For the detection of gastroenteric viruses the ideal samples would be fresh, diarrheal and unpreserved feces. In clinical practice, these kinds of samples represent a much lower percentage when compared to samples containing preservatives based on formaldehyde. Formalin is an important interferant for the use of molecular detection techniques, being able to reduce the efficiency of oligonucleotide pairing, to fragment DNA and RNA molecules, to hinder the precipitation of nucleic acids during the extraction process and to decrease the catalytic capacity of the Taq Polymerase. The first step in the use of molecular techniques is the extraction of the genetic material, so comparing different extraction methods to recover viral nucleic acids in formalin-conditioned feces samples may provide a diagnostic alternative for RNA and DNA viruses. To do this, three extraction methodologies were compared for the detection of four gastroenteric viruses that are important causative agents of gastroenteritis using the PCR technique. It was possible to demonstrate that the addition of RNA-Carrier during the extraction of samples increased the amount of genetic material recovered; the concentration of DNA used as template for PCR is an important factor for a successful amplification depending on the technique used; and among the methodologies tested, one has been shown to be more effective, has a lower cost and may be an important tool for the

use of biological samples that tend to be discarded in epidemiological surveys due to their non-compliance by the addition of formaldehyde. Non-investigation of these samples impacts on underestimated results of incidence and prevalence of these viral agents.

KEYWORDS: formaldehyde, formalin, RNA-Carrier, gastroenteric viruses, nucleic acid extraction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A GASTROENTERITE

A diarreia é a manifestação clínica mais comum nos quadros de gastroenterite, esse sintoma caracteriza-se como três ou mais episódios de evacuação líquida no período de um dia. E em casos mais graves podem ocorrer náuseas e vômitos. Em todo mundo estima-se que um bilhão e setecentos mil casos de gastroenterite ocorram todos os anos.¹ Tal quadro pode ser desencadeado por bactérias, parasitos e vírus presentes como contaminantes em alimentos e água. É uma manifestação clínica debilitante, podendo ser fatal especialmente em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos tais como portadores do vírus HIV e transplantados nos quais a manifestação pode induzir desidratação profunda. Dentre esses casos, 760 mil levam crianças à óbito, fazendo da gastroenterite a principal causa de desnutrição e a segunda maior causa de mortes em crianças abaixo dos 5 anos de idade.¹

1.2. BACTÉRIAS E PARASITOS

Os surtos causados por bactérias são relativamente mais comuns em países em desenvolvimento, as bactérias mais comumente associadas à gastroenterite são *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter* e *Salmonella*. Com relação às bactérias gram-negativas as *Escherichia coli* por meio da aquisição de determinantes genéticos podem se tornar patogênicas aumentando a capacidade de aderência e toxicidade.² As *E. coli* causadoras de gastroenterite estão hoje divididas em seis grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC).^{3,4}

Os parasitos são encontrados, principalmente, em países subdesenvolvidos, infelizmente boa parte das moléstias causadas por esses é negligenciada.⁵ No Brasil, por exemplo, as enteroparasitoses constituem um importante problema de saúde pública, causam altas taxas de morbidade e mortalidade. Crianças abaixo dos cinco anos de idade estão mais expostas a esse tipo de infecção o que representa risco ao desenvolvimento nutricional e cognitivo. As manifestações mais frequentes nessa faixa etária são quadros anêmicos importantes, diarreia crônica, desnutrição e obstrução intestinal.⁶

1.3. ROTAVÍRUS

Os vírus gastroentéricos, apesar de causarem maior quantidade de surtos em países industrializados, também estão presentes em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, tendo, portanto, distribuição mundial. As famílias virais mais associadas a quadros gastroentéricos são a *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Reoviridae* e a *Adenoviridae*.⁷ Ao longo dos últimos anos, vírus dessas famílias têm sido detectados em surtos de gastroenterite com manifestações clínicas que variam desde episódios diarreicos autolimitados e de curta duração, até a ocorrência de complicações que demandam a internação e que em alguns casos evoluem ao óbito.¹

Em 1973 Bishop visualizou a partícula viral de um Rotavírus pela primeira vez por meio de micrografia eletrônica de secções de mucosa duodenal, e mais tarde observou o vírus em fezes de um indivíduo com gastroenterite por microscopia eletrônica.⁷

Os Rotavírus são vírus de RNA linear segmentado de dupla fita, sem envelope, possuem um capsídeo icosaédrico de três camadas proteicas e medem 100nm, seu capsídeo maduro é composto por um arranjo de 60 proteínas espiculares externas.⁸ São divididos em sete grupos de A a G, sendo os patógenos humanos pertencentes aos grupos A, B e C, são ainda

subdivididos em um vasto grupo de genótipos que leva em consideração os antígenos do capsídeo viral.⁸

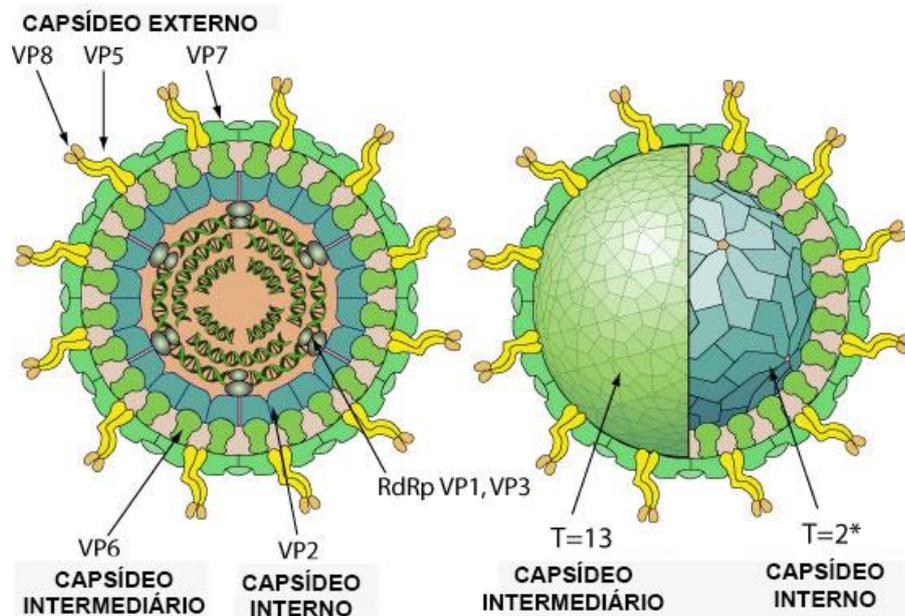


Figura 1: Estrutura da partícula viral de um Rotavírus. Fonte: adaptado de Viralzone⁹

Seu genoma completo tem aproximadamente 18,5kB e conta com onze segmentos que codificam 12 proteínas. Na extremidade 5' o vírus possui um *cap* metilado, mas não possui cauda poly-A na extremidade 3', ao invés disso possui uma sequência UGACC que é conservada em todos os genes virais. A maior parte dos segmentos do genoma é policistronica a codificação de proteínas varia de acordo com a espécie que vai de A a I.^{8,9}

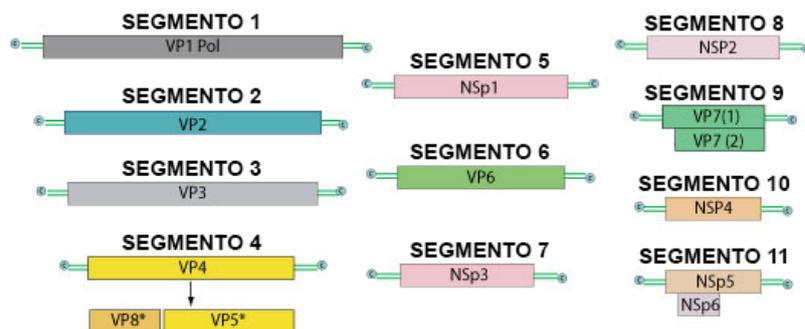


Figura 2: Estrutura do genoma do Rotavírus. Fonte: adaptado de Viralzone⁹

Por muitos anos o Rotavírus foi considerado o maior causador de episódios diarreicos em crianças. Com a implementação da vacina na rotina de imunização infantil foi possível observar um declínio da incidência em países desenvolvidos, como demonstra um estudo nacional desenvolvido entre os anos de 2000 e 2015 em todo território norte-americano.¹⁰ Além disso, com o barateamento e maior acesso a técnicas moleculares, a investigação de surtos gastroentéricos abriu o horizonte para a detecção de novos agentes etiológicos, o que colaborou para a detecção de outros vírus nos últimos anos.¹⁰

1.4. NOROVÍRUS

Apesar dos Rotavírus terem sido considerados por muitos anos como os vírus mais prevalentes em casos de gastroenterite, dados recentes estimam que um em cada cinco casos de gastroenterite no mundo seja causado por um membro da família *Caliciviridae*, o Norovírus (NoV), o que o torna o mais prevalente entre todos os vírus gastroentéricos.¹¹ Curiosamente, este foi o primeiro vírus associado à gastroenterite em humanos.¹² Em um estudo realizado por meio de microscopia eletrônica na cidade de Norwalk em Ohio, Kapikian e colaboradores em 1977 visualizaram a presença de uma partícula em filtrados infecciosos de fezes humanas coletadas em um surto, que viria mais tarde a ser identificada e batizada de Norovírus em alusão ao nome da cidade de Norwalk¹².

De um modo geral o curso da infecção é rápido, dura de 12 a 72 horas e os sintomas costumam surgir após as primeiras 24 e 48 horas após o contato com o vírus.¹³ Os sintomas comuns são diarreia, vômito e mal-estar, em alguns casos podem aparecer dor abdominal, náusea e febre baixa; de caso a caso os sintomas podem perdurar mais dependendo do estado imunológico e da idade¹⁴.

Nos últimos anos também foi possível demonstrar que os Norovírus não estão envolvidos somente com casos de gastroenterite, mas também com enterocolite necrotizante em crianças, encefalopatia e síndrome do

intestino irritado.¹⁴ Houve um relato de um grupo de soldados britânicos que estavam em missão no Afeganistão e que adoeceram repentinamente. Todos apresentavam gastroenterite, sendo que dois deles tinha rigidez de nuca, cefaleia e fotofobia, um deles apresentou coagulação intravascular disseminada (*CIVD*), dois precisaram de suporte ventilatório, e dois dos médicos que cuidaram da equipe desenvolveram gastroenterite. Todos os testes bacteriológicos realizados foram negativos e, já no Reino-Unido, foram realizadas microscopia eletrônica, ELISA e *qPCR* de todas as amostras de fezes, sendo detectada a presença de Norovírus GII¹⁵. Não há como afirmar que o agente etiológico de tais sintomas foi o Norovírus, mas abre uma perspectiva para que pensemos no agente como causador de outras moléstias que não a gastroenterite.¹⁵

A transmissão das partículas se dá de pessoa a pessoa, na água ingerida ou como contaminante de hortaliças e contaminação direta na manipulação dos alimentos. Os Norovírus são apontados como importantes responsáveis tanto por surtos quanto por casos isolados na comunidade e em ambientes hospitalares, neste último caso, especialmente em países desenvolvidos.¹⁶ Muito disso se deve a alta resistência que o vírus possui ao ambiente, ao prolongado período em que os indivíduos infectados liberam partículas virais em suas fezes e vômito, ao baixo inóculo necessário para causar uma infecção (menos de cem partículas virais por inóculo) e ao fato de o vírus ser resistente às soluções desinfetantes mais comuns.¹⁶

Estudos relacionados à epidemiologia dos Norovírus segregaram as gastroenterites relacionadas a eles em quatro grupos de acordo com as condições que propiciam a propagação do patógeno e o tipo de indivíduo infectado pelo vírus. O grupo 1 compreende surtos de origem alimentar, em que a infecção se dá pela ingestão de alimentos ou água contaminada com o agente, levando em conta ainda o contato oro-fecal de pessoa a pessoa como fonte potencial de propagação da infecção. Os adultos jovens são os mais acometidos com sintomas que se manifestam por não mais que três dias;¹⁷ no grupo 2 os quadros ocorrem em locais fechados com manifestações clínicas que duram de quatro até seis dias sem distinções

etárias; a gastroenterite infantil que, em grande parte das vezes, requer hospitalização constitui o grupo 3 e o grupo 4 é composto por quadros agudos esporádicos em imunocomprometidos.¹⁸

Estimativas apontam que anualmente em todo mundo, ocorrem 685 milhões de quadros de gastroenterite provocados por Norovírus, sendo 200 milhões deles em crianças abaixo dos cinco anos de idade, população em que os casos são particularmente mais graves. Entre custos relacionados em atenção à saúde propriamente dita (internações, tratamento de complicações, mão de obra especializada) e perdas relacionadas à produtividade (pessoas que não podem trabalhar por estarem doentes, empresas alimentícias e de entretenimento que têm seus nomes denegridos por estarem ligadas a surtos gastroentéricos) avalia-se um prejuízo mundial de US\$ 60 bilhões por ano, somente em casos associados a esse agente.¹¹

Os Norovírus são vírus de RNA linear de fita simples com senso positivo, desprovidos de envelope, possuem um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 38 a 40nm, seu capsídeo maduro é composto por um arranjo de 90 proteínas estruturais VP1 que formam depressões que se assemelham à forma de um cálice, o que dá nome a família a que pertencem, *Caliciviridae*. Víriões vazios possuem 23nm e são compostos por 60 proteínas estruturais VP1.¹⁶ Figura 1

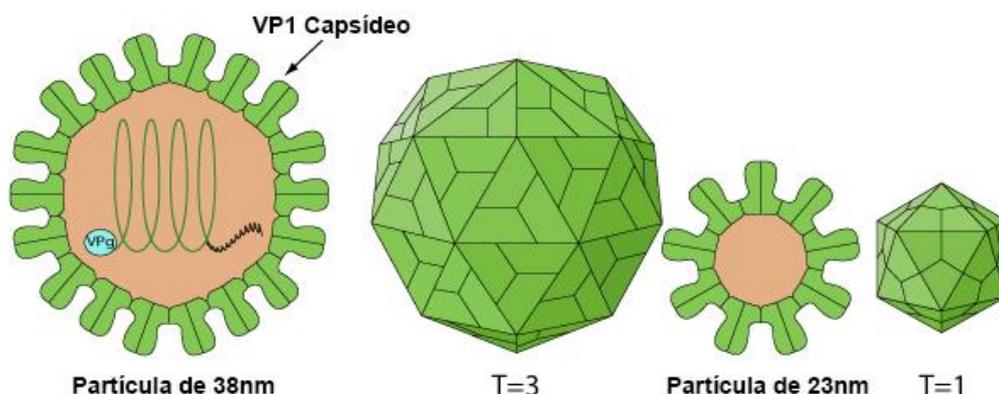


Figura 3: Estrutura da partícula do Norovírus. Fonte: adaptado de Viralzone¹⁹

Na extremidade 5' do genoma existe a proteína *VPg*. Na outra extremidade há uma cauda poly-A. O genoma completo tem aproximadamente 7,5kB e conta com três regiões de leitura aberta (*ORFs*). A *ORF1* codifica uma poliproteína que quando clivada por uma protease viral dá origem a seis proteínas não estruturais, a p48, NTPase, p22, *VPg*, Pro e RdRp.²⁰

A proteína p48 está hipoteticamente associada ao transporte das proteínas virais mediado por vesículas; a proteína NTPase possui características semelhantes à helicase, contudo, não há evidências de que desempenhe o mesmo papel; a proteína p22 presumidamente tem papel de direcionar o complexo de replicação para as membranas intracelulares;²⁰ a proteína *VPg* está associada a infectividade do vírion e a tradução inicial, McSweeney e colaboradores em 2019 demonstraram que *in-vitro*, a proteína seria capaz de induzir a parada do ciclo celular entre G0/G1 o que garantiria ao vírus um ambiente de replicação mais benéfico;²¹ a proteína Pro é a proteinase viral responsável por processar a poliproteína oriunda da *ORF-1* viral; e por fim, a RDRP ou POL que é a RNA polimerase dependente de RNA.²⁰

A *ORF-2* codifica a VP1, principal proteína do capsídeo viral.²² A terceira *ORF* codifica outra proteína estrutural (VP2) e é a região mais variável do genoma viral.²³ (Figura 2).

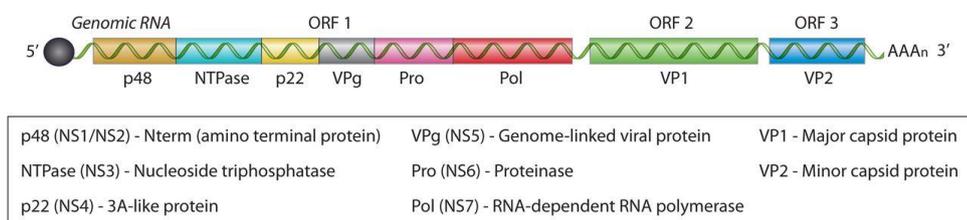


Figura 4: Estrutura do genoma viral do Norovírus. Fonte: adaptado de Robilotti¹⁶

Com base em sua caracterização molecular são divididos em seis genogrupos (GI a GVI) e esses genogrupos em mais de quarenta genótipos; tanto em surtos quanto em casos esporádicos, os genogrupos GI, GII e GIV

já foram encontrados em humanos, sendo o genogrupo GII, genótipo 4 (GII.4) responsável por 90% dos quadros infecciosos em escala mundial^{11, 20}.

Devido ao fato de ser um vírus bastante presente em países desenvolvidos e desencadear surtos em ambientes hospitalares como centros de referência para tratamento de câncer e transplante de órgãos, ocorre nos últimos anos a necessidade crescente do surgimento de uma vacina e alguma droga que possa auxiliar a contenção desses surtos. Algumas drogas como a ribavirina e a nitazoxanida foram testadas em um número limitado de pacientes, mas os resultados obtidos não demonstraram grande impacto no quadro dos pacientes, o que reforça ainda mais a necessidade de estudos voltados para essa finalidade.^{11, 24, 25} Outro desafio é que o conhecimento atual demonstra que há ausência de proteção cruzada entre os genogrupos dos vírus e que mesmo a proteção cruzada dentro de genótipos de um mesmo genogrupo ainda é limitada.²⁶

1.5. SAPOVÍRUS

Durante um surto no ano de 1977 em um orfanato na cidade de Sapporo no Japão, um grupo de pesquisa liderado por Chiba, associou a presença de um calicivírus encontrado nas amostras de fezes das crianças com o surto. Entre os anos de 1977 e 1982 houve uma série de novos surtos associados à mesma partícula descrita por Chiba, o vírus acabou recebendo o nome de Sapporo vírus e posteriormente se tornou Sapovírus (SaV).²⁷

Os sintomas desencadeados pelos Sapovírus são autolimitados e começam a surgir entre 12 e 48 horas após a exposição e duram entre 2 e 6 dias a depender de cada organismo e os sintomas são mais brandos e os óbitos são raros.^{28, 29} Comumente o paciente apresenta diarreia e vômito, e em aproximadamente metade dos casos esses dois sintomas podem ser acompanhados por febre.²⁹ Não tão incomum, é o fato de que a infecção por esse vírus pode ser assintomática e a liberação de partículas virais contínua,

entre 10^6 a 10^9 cópias do vírus por grama de fezes, o que se torna um problema entre manipuladores de alimentos e profissionais da saúde.³⁰

Inicialmente eram tidos como patógenos exclusivos de crianças, assim como no surto em que foi descoberto, mas com o passar dos anos, apesar de haver pouca literatura sobre a incidência dos Sapovírus, alguns desses estudos demonstraram sua distribuição em todas as faixas etárias. Um estudo americano e um britânico estimaram quantos casos de sapovirose ocorriam por ano a cada mil habitantes, os resultados foram nove casos e 26 casos.^{31,32}

Apesar de haver o entendimento de que o vírus pode ser transmitido por meio de contaminação de alimentos, estima-se que os casos que ocorrem por esse motivo são menores que 1% do total. Num estudo holandês que defende que a única via significativa de contágio pelo vírus seria o contato de pessoa a pessoa, quando houver contato com vômito ou fezes de indivíduos infectados pelo patógeno.^{33, 34} Em contrapartida, dois estudos de grupos japoneses demonstraram a presença de Sapovírus em ostras^{35, 36} e em um dos estudos o vírus era geneticamente compatível com outros Sapovírus encontrados em fezes de pacientes.³⁵ A contestação é, se o vírus foi ingerido juntos com as ostras ou se as ostras entraram em contato com água de esgoto que continha o vírus proveniente de pacientes infectados.

Os Sapovírus são vírus de RNA de fita simples com senso positivo, sem envelope e pertencem à família *Caliciviridae*.³⁷ O genoma mede entre 7.1 e 7.7kB e contém duas *ORFs*, e uma hipotética terceira *ORF* que codificaria a proteína VP3 ainda não caracterizada.^{37, 38, 39, 40} A primeira *ORF* codifica uma poliproteína que quando clivada dá origem a proteínas não estruturais do vírus, contígua a essa poliproteína está a VP1, principal proteína do capsídeo viral. Acredita-se que na pequena *ORF-2* ocorre a codificação da proteína VP2.^{38,39} (Figura 5).

As proteínas derivadas da poliproteína viral são as mesmas presente nos Norovírus, com a diferença que as proteínas PRO-POL sofrem auto-clivagem juntas e posteriormente as outras proteínas podem ser clivadas

pela ação da proteinase viral. Seu capsídeo maduro é constituído por um arranjo de 180 proteínas e em seu interior carrega a proteína VP2 e o RNA genômico que é injetado no citoplasma da célula hospedeira por endocitose.^{38, 39}

Os Sapovírus possuem sete genogrupos do GI ao GVII, sendo que apenas os genogrupos GI, GII, GIV e GV infectam humanos e os genogrupos GIII, GVI e GVII infectam suínos.⁴¹

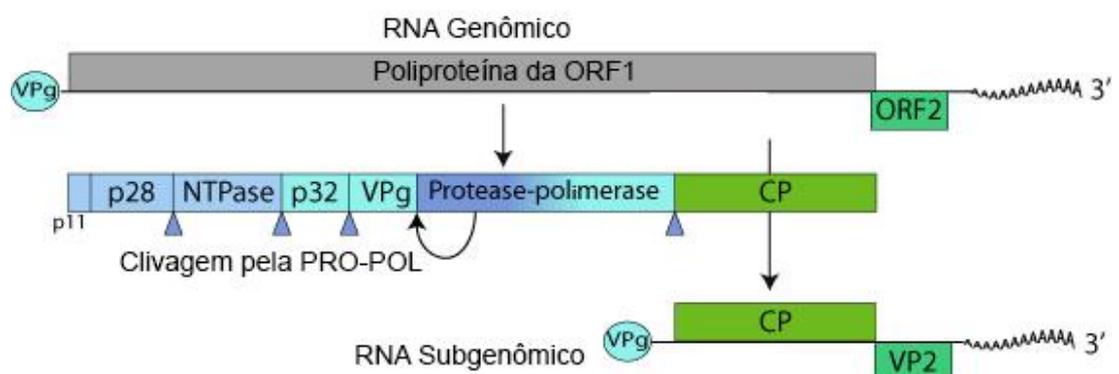


Figura 5: Estrutura do genoma do Sapovírus. Fonte: adaptado de Viralzone⁴²

1.6. ADENOVÍRUS

No ano de 1953 um grupo de pesquisa liderado por Wallace Rowe estava trabalhando com uma cultura celular oriunda de tecido de adenoide humano e perceberam uma degeneração celular muito específica. Fizeram então diluições seriadas dessa cultura com degeneração e observaram que o dano tecidual podia ser transmitido para uma cultura sem lesão tecidual.⁴³

Anos após a primeira descoberta, os adenovírus humanos (*HAdV*) são divididos em sete espécies que vão de A-G de acordo com a reatividade nas técnicas de hemaglutinação e soroneutralização dos epítopos antigênicos e ainda de acordo com a sequência do genoma, propriedades oncogênicas em filhotes de hamster e o tipo de patologia que causam nos seres humanos. São ainda segregados em mais de 50 sorotipos que estão inseridos dentro destas espécies, de acordo com o tropismo viral. Outro fato

importante é que alguns sorotipos do vírus são resultados entre recombinações de mais de um sorotipo.⁴⁴

O papel dos *HAdV* como causadores de gastroenterite foi discutido por anos por diversos grupos de pesquisa. Durante os últimos anos foi possível esclarecer algumas dúvidas.^{44, 45, 46} A detecção de adenovírus em fezes não quer dizer especificamente que este seja o agente causador da gastroenterite, uma vez que *HAdV* respiratórios podem ser eliminados nas fezes. Contudo, estudos realizados há alguns anos observaram um grupo de *HAdV* não cultiváveis em culturas celulares, diferente das espécies respiratórias, estes foram estudados e associados aos casos de gastroenterites, sendo eles os tipos 40 e 41 da espécie F.^{44, 45, 46}

Outro quadro intestinal ligado a alguns pacientes com *HAdV* é a intussuscepção. Nesse quadro, um segmento no intestino se invagina por sobre outra parte do intestino, assim como um telescópio se retrai por sobre outra parte do mesmo. Estudos de diversas partes do mundo foram capazes de demonstrar a presença de *HAdV-C* nesses pacientes, desde a microscopia eletrônica, até biópsia de linfonodos removidos cirurgicamente durante a correção da intussuscepção.⁴⁴

A doença celíaca é uma manifestação autoimune em que o indivíduo inicia a produção de anticorpos contra diversas proteínas presentes no trigo e em outros cereais, dentre elas a proteína Gliadina.⁴⁴ Os Adenovírus-12 possuem uma proteína chamada E1B-55K que é homóloga à Gliadina e que é reconhecida de forma cruzada por anticorpos anti-Gliadina. Diversos estudos encontraram evidências da presença de *HAdV-A 12* em fezes de indivíduos com doença celíaca, muito embora a maior parte dos pesquisadores não acredite que a doença se deve a presença do vírus, acreditam que a presença pode ter alguma importância na patogênese e agravamento do quadro.⁴⁴

Os sintomas costumam surgir entre 8 e 10 dias após o contato com o vírus, os sintomas comuns são diarreia e vômito que induzem a desidratação, especialmente em crianças, dor, distensão abdominal e febre não muito alta, além disso, os adenovírus podem causar sintomas

semelhantes ao de uma gripe, conjuntivite, pneumonia, cistite, e em casos mais raros, doenças do sistema neurológico.^{47, 48, 49}

Uma diferença do quadro diarreico desencadeado pelos adenovírus é que diarreia pode persistir por períodos mais longos, em média dez dias, o que contribui para o quadro de desidratação.^{47, 48}

Os adenovírus acometem principalmente crianças na primeira infância, contudo, pode ocorrer em todas as faixas etárias, sendo mais comum em jovens adultos que em idosos. A distribuição do vírus é mundial e a incidência varia entre 1 a 8% em inquéritos epidemiológicos, a depender do local onde o estudo é realizado.^{47, 48}

Os adenovírus pertencem à família *Adenoviridae* e possuem tamanho médio, entre 90 e 100nm, são vírus de DNA de dupla fita linear não segmentada, o capsídeo tem simetria icosaédrica e não possuem envelope.^{48,49}

O vírion tem 11 proteínas (TP, II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX e X), sete delas encontram-se no capsídeo viral destacando-se 3 delas, o hexon (II) que é a principal proteína do capsídeo, a penton-base (III) e a fibra (IV) que formam o vértice do capsídeo viral. A proteína fibra é a primeira a ser reconhecida pela célula hospedeira e é extremamente importante para a internalização do vírus.^{48, 49} (Figura 6)

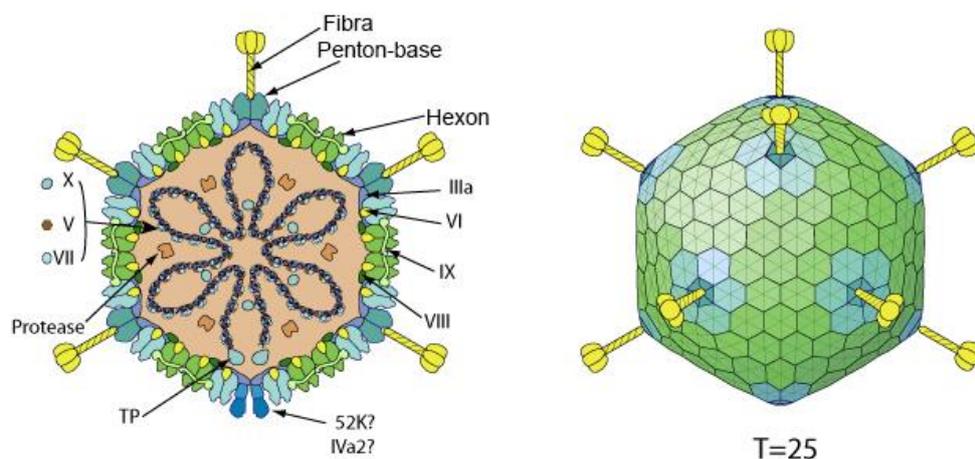


Figura 6. Estrutura da partícula viral do Adenovírus. Fonte: adaptado de Viralzone⁵⁰.

1.7. DIAGNÓSTICO DAS GASTROENTERÍTES

A ocorrência de gastroenterite proporciona importante impacto econômico devido aos elevados gastos com o atendimento nutricional, o tratamento medicamentoso, a necessidade de visitas médicas, o elevado número de admissões hospitalares e o dispêndio com diagnóstico.¹¹

Atualmente estão disponíveis diversos métodos para detecção de patógenos potencialmente envolvidos em casos de gastroenterite. Desde as técnicas mais simples como ensaios imunológicos, as quais não podem nem devem ser abolidas da rotina laboratorial, até técnicas mais elaboradas e dispendiosas que nos últimos anos têm auxiliado na detecção de patógenos antes subnotificados, como é o caso dos vírus gastrointestinais.^{51, 52, 53}

No caso das bactérias, a coprocultura juntamente com o antibiograma continuam sendo uma importante ferramenta para a detecção e identificação destes microrganismos, bem como juntas norteiam a terapêutica a ser utilizada em cada paciente. Em alguns casos específicos como na detecção de *C. difficile* e *Campylobacter* e com a emergência de bactérias portadoras de genes de resistência, se faz necessário o uso de técnicas direcionadas a detecção de antígenos e o uso da biologia molecular⁵¹

Para a detecção de parasitos gastrointestinais, a não ser por alguns casos peculiares, de modo geral, a utilização de microscopia direta com e sem a utilização de formalina continua sendo a ferramenta com melhor custo benefício e simplicidade de execução.^{52, 53} A utilização de formalina é amplamente difundida, muito embora a exposição prolongada a esse agente possa degradar algumas estruturas parasitárias e modificar a morfologia desses microrganismos, o que dificulta a identificação dos mesmos.^{52, 53}

Ainda assim, alguns estudos comparativos de exames à fresco e aqueles em que a formalina tamponada foi utilizada, demonstram que a utilização do conservante aumenta consideravelmente a sensibilidade da detecção, ainda que métodos de concentração se mostrem mais eficientes que os anteriormente citados.^{54, 55} Em países subdesenvolvidos, caso do

Brasil, a prevalência de parasitos intestinais ainda é muito alta, em especial em regiões onde houve menos avanço no processo de urbanização e industrialização, isso faz com que o uso da formalina seja amplamente difundido na rotina laboratorial.^{56, 57, 58}

No ano de 1991 chegou ao Brasil a sétima pandemia de cólera, diante de tal adversidade o ministério da saúde observou a necessidade da monitorização da doença diarreica por meio de cada município brasileiro. Foi então criada a Coordenação Nacional de Doenças Entéricas do Centro Nacional de Epidemiologia, no ano de 1994 foi viabilizado o sistema de vigilância sentinela, a monitoração da doença diarreica aguda (MDDA) que mesmo depois de findada a pandemia de cólera permaneceu ativa e agora focada no controle de surtos ocasionados por outras bactérias, vírus, toxinas e parasitos transmitidos por contato de pessoa a pessoa, alimentos ou água contaminados.^{59, 60, 61} Esse programa realiza o acompanhamento dos casos ocorridos durante cada semana epidemiológica do ano a fim de detectar precocemente surtos e possível introdução de patógenos na cadeia produtiva de alimentos, de abastecimento de água e em demais circunstâncias que possam ser prejudiciais à saúde humana. Os agentes virais pesquisados são Rotavírus, Norovírus, Adenovírus Entéricos e Astrovírus, muito embora, os testes para detecção de todos esses agentes não estejam disponíveis em todos os municípios brasileiros.^{59, 60, 61}

Outro grande problema é que a maior parte das amostras de fezes que chegam aos laboratórios de diagnóstico são conservadas em formalina tamponada.^{52, 53, 54, 55, 60, 61} O padrão ouro para diagnóstico da maior parte das viroses gastrointestinais necessita da realização de testes de biologia molecular, a grande dificuldade é que a formalina é um importante interferente para a técnica de PCR por gerar danos ao DNA e RNA.⁶²

No caso do RNA, por exemplo, a presença de formaldeído é capaz de bloquear o pareamento de bases e ainda induzir a ligação da molécula de RNA com outras macromoléculas o que dificulta a sua precipitação durante o processo de extração. Grupos monometilol ligam-se aos grupos amino nas bases nitrogenadas, em especial nas adeninas o que reduz a eficiência de

pareamento com os oligonucleotídeos e conseqüentemente a conversão do RNA em cDNA.^{62, 63, 64}

No DNA a formalina induz a formação de monoadutos de N-hidroximetil nas guanidinas, adeninas e citosinas, além disso, induza a formação de *crosslinks* entre as purinas adjacentes, todas essas alterações em um organismo vivo seriam potencialmente fatais se não fossem contornadas por mecanismos de reparo, no caso do PCR, são capazes de dificultar o anelamento de oligonucleotídeos ao sítio de interesse, além de fragmentar sequências de DNA.^{62, 65}

Diversos estudos tratam da recuperação de material genético de tecidos fixados em blocos de parafina para cortes histológicos, acontece que essa preparação leva formol, que tem o papel de preservar esses tecidos e estruturas que serão observadas ao microscópio em lâminas. Diversas técnicas são discutidas, como o aquecimento dessas peças e sucessivas lavagens com soluções tamponadas de diferentes pHs a fim de retirar o excesso de formol e reverter as ligações que ocorrem nos ácidos nucleicos.^{62, 63, 65, 66}. Contudo, em nenhum desses estudos as fezes são utilizadas como amostra biológica.

Tendo em vista que em inquéritos epidemiológicos virais, amostras de fezes conservadas em formalina são geralmente descartadas devido à interferência do reagente nas técnicas moleculares, estudos que investigam a recuperação de ácidos nucleicos virais dessas amostras poderiam auxiliar na redução da subnotificação desses agentes uma vez que descrevessem uma técnica capaz de recuperar, com eficiência, os ácidos nucleicos dos patógenos de amostras dessa natureza.

2. JUSTIFICATIVA

Para o isolamento de bactérias e vírus causadores de gastroenterites, as amostras ideais seriam as fezes frescas, diarreicas e sem conservante. Contudo, na prática clínica, a obtenção destas amostras representa um percentual muito menor se comparado com as amostras contendo conservantes à base de formol, que são atualmente os mais utilizados nos laboratórios de análises clínicas para a conservação de fezes, especialmente a formalina tamponada a 10%.

Muitas situações, como o caso de infecção por Sapovírus, o paciente pode ser assintomático e ainda liberar uma carga viral elevada nas fezes.

Poucos são os estudos que tratam sobre a conservação de amostras fecais em formalina com o intuito de recuperar RNA viral. A formalina é descrita na literatura como um importante interferente em biologia molecular, e assim, é importante a busca de uma solução que possa ser capaz de reduzir a subnotificação da detecção de vírus gastroentéricos, uma vez que não há garantias de que uma amostra de fezes conservada em formol é realmente negativa ou sua negatividade é reflexo do efeito do formol.

É importante que estudos desse tipo sejam feitos, uma vez que em alguns casos a diarreia desencadeada por vírus pode durar apenas doze horas, e se a amostra for coletada em um frasco com formalina esta poderia ser analisada após uma pesquisa de parasitos negativa e com presença de sintomas clínicos de gastroenterite. Não há como intervir clinicamente no quadro do paciente, mas inquéritos epidemiológicos municiam o estado de dados que alicerçam, por exemplo, a justificativa da necessidade de implantação de uma vacina no calendário de vacinação infantil.

O passo fundamental para que os testes moleculares possam ser precisos na detecção dos agentes é uma extração do material genético de qualidade que garanta a quantidade e a viabilidade para este que possa ser amplificado e detectado.

Desse modo, a comparação de diferentes métodos de extração para recuperar ácidos nucleicos virais em amostras de fezes acondicionadas com formalina pode apresentar uma alternativa diagnóstica para vírus de RNA e DNA.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO PRIMÁRIO

1. Comparar a extração de material genético viral pelos métodos de coluna de sílica e *microbeads* magnéticas automatizado, de amostras fecais conservadas em formalina tamponada a 10%.

3.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Verificar se a adição de *RNA-Carrier* (composto que auxilia na precipitação e RNA e DNA) no método automatizado por *microbeads* aumenta a quantidade e viabilidade do RNA extraído para detecção molecular.
2. Verificar se a adição de *RNA-Carrier* à metodologia impacta de alguma forma a quantidade e viabilidade do DNA extraído para detecção molecular.
3. Observar se há diferença na quantidade e viabilidade do material genético recuperado por diferentes metodologias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Foram utilizadas como controles positivos para o presente estudo, quatro amostras clínicas de fezes suspensas em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2, cada uma delas positiva para um agente, sendo eles: Adenovírus, Sapovírus, Norovírus GI e Norovírus GII. Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo grupo de Virologia da Universidade Federal do Goiás (UFG) e a amostra de Adenovírus pelo Núcleo de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública do DF (LACEN-DF). A detecção dos agentes nas amostras foi realizada pela técnica de PCR, os Sapovírus, Norovírus GI e GII nos laboratórios da UFG e o Adenovírus no Núcleo de Virologia do LACEN.

4.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para verificar o efeito da formalina nos ácidos nucleicos virais foram feitas duas alíquotas de cada um dos vírus, em uma alíquota foi adicionada formalina tamponada a 10% na proporção de 1:1 (300µL de amostra e 300µL de formalina) e uma alíquota de fezes pura, a concentração de 10% foi utilizada por ser a concentração padronizada para coleta de fezes na maior parte dos laboratórios clínicos. Ambas as amostras foram incubadas por um período de 24 horas sob refrigeração e posteriormente, foram submetidas à extração de ácidos nucleicos utilizando a coluna de sílica do *kit* de extração *PureLink™ Viral RNA/DNA Minikit*, da Invitrogen, esse método de extração leva *RNA-Carrier* como recomendação do fabricante. O produto de extração foi dosado utilizando o *NanoDrop™*.

Para verificar a diferença na eficiência de extração de ácidos nucleicos em amostras com formol por diferentes métodos de extração, foram preparadas três alíquotas com formalina tamponada a 10% de cada

um dos vírus, na proporção de 1:1 (300µL de amostra e 300µL de formalina). Essas alíquotas foram submetidas a três procedimentos de extração diferentes: 1) extração por coluna de sílica; 2) metodologia automatizada que utiliza *microbeads* magnéticas para extração de ácidos nucleicos virais e 3) pela mesma metodologia de *microbeads* magnéticas adicionando 5,6µL de *RNA-Carrier* (ajustado ao volume de 140µL de tampão lise) antes da precipitação dos ácidos nucleicos. Após essa segunda rodada de extrações, foi realizada a quantificação de cada uma das extrações utilizando o *NanoDrop™*.

4.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a Transcrição Reversa de Sapovírus, Norovírus GI e Norovírus GII foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada reação foi adicionado a um microtubo 3,2µL de água Nuclease-free, 2,0µL do tampão de RT 10X, 0,8µL de dNTP a 100mM, 2,0µL de oligonucleotídeos randômicos a 10nM, 1,0µL da enzima MultiScribe™ RT e mais 9,0µL do produto de extração. As temperaturas e tempos para a transcrição reversa foram: 25°C por 10 minutos, seguido da ativação da enzima a 37°C por 120 minutos, um aquecimento a 85°C por 5 minutos para a inativação da enzima, e o resfriamento das amostras a 4°C.

4.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E GEL DE AGAROSE

Para as PCRs foi adicionado a um microtubo 2,0µL de Tampão de Taq Polimerase 10X sem MgCl₂ (Invitrogen, EUA), 1,0µL de cada par de oligonucleotídeo específico a 10mM/µL, 0,5µL de dNTPs a 10mM/µL (Invitrogen, EUA), 0,5µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), 0,75µL de MgCl₂ a 50mM e o DNA de cada um dos agentes em três quantidades diferentes. A quantidade de DNA adicionado aos microtubos foi segregada em três experimentos: primeiro experimento: utilizados 4µL (primeiro valor

utilizado para padronização da técnica) do produto de extração ou produto de RT, no caso dos vírus de RNA, por coluna de sílica dos vírus com formol e sem formol; segundo experimento: 25µg/mL (volume em µL variável de acordo com a quantificação no *NanoDrop™*) de DNA de cada um dos vírus adicionados de formol em cada uma dos três métodos testados; terceiro experimento: 50µg/mL (volume em µL variável de acordo com a quantificação no *NanoDrop™*) de DNA de cada um dos vírus adicionados de formol em cada uma dos três métodos testados. O volume das reações foi completado com água *Nuclease-free* de acordo com a quantidade de DNA utilizado em cada experimento.

Os tempos e temperaturas utilizados na PCR foram: uma temperatura inicial de 94°C, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 15 segundos; uma extensão final de dez minutos a 72°C, resfriando logo em seguida a 4°C. A temperatura escolhida para anelamento de todos os oligonucleotídeos foi definida por teste de gradiente de temperatura, buscando um valor que contemplasse a detecção de todos os vírus em uma mesma faixa de temperatura. Os pares de oligonucleotídeos utilizados para cada um dos vírus estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 | Oligonucleotídeos utilizados na PCR para a identificação molecular dos vírus

Vírus	Nome	Sequência 5'-3'	Amplicon
Norovírus GI	G1SKF	+ CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	330pb
	G1SKR	- CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	
Norovírus GII	COG2F	+ CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	387pb
	G2SKR	- CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	
Sapovírus	SLV5317	+ CTC GCC ACC TAC RAW GCB TGG TT	100pb
	SMP-R	- CMW WCC CCT CCA TYT CAA ACA C	
Adenovírus	Ad1	+ TTC CCC ATG GCI CAY AAC AC	482pb
	Ad2	- CCC TGG TAK CCR ATR TTG TA	

Fonte: Khamrin *et al*⁶⁷

Os *amplicons* foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio. A Corrida realizada em 50 minutos e os géis

visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em um fotodocumentador L.PIX do fabricante Loccus.

4.5. INOCULAÇÃO DE FEZES FRESCAS COM CONTROLE POSITIVO

Esse teste teve o intuito de reproduzir um ambiente mais próximo o possível da realidade de uma amostra biológica de fezes acondicionada em formalina tamponada, quanto às características das fezes (pH, presença de nucleases, etc). Levando em consideração que os controles utilizados eram suspensões de fezes em tampão PBS, para reproduzir um ambiente mais real aos controles, duas alíquotas de 300µL de controles positivos (uma de Adenovírus e uma de Sapovírus) foram inoculadas a 3 gramas fezes frescas sabidamente negativas (testados pela técnica de PCR) para os vírus testados.

Posteriormente essas misturas foram adicionadas a frascos contendo formalina tamponada a 10% e incubadas em geladeira por 24 horas. Após a incubação, essas amostras foram homogeneizadas e extraídas por meio da metodologia de coluna de sílica de acordo com o fabricante. A amostra inoculada com Sapovírus foi submetida a transcrição reversa como já descritas e ambas as amostras amplificadas por PCR utilizando 50µg/mL de DNA e posteriormente reveladas em gel de agarose a 1,5%.

4.6. ASPECTOS ÉTICOS

O atual projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília: CAAE: 31843414.6.0000.0030 de acordo com a Resolução CNS 466/2012.

5. RESULTADOS

5.1. VERIFICANDO O EFEITO DA FORMALINA SOBRE OS ÁCIDOS NUCLEICOS

Com as amostras extraídas por coluna de sílica, foi possível observar uma discreta queda na quantidade de ácidos nucleicos recuperados das amostras com adição de formol conforme disposto no Gráfico 1. Também houve queda no grau de pureza do material genético recuperado das amostras em que o formol foi adicionado (Gráfico 1).

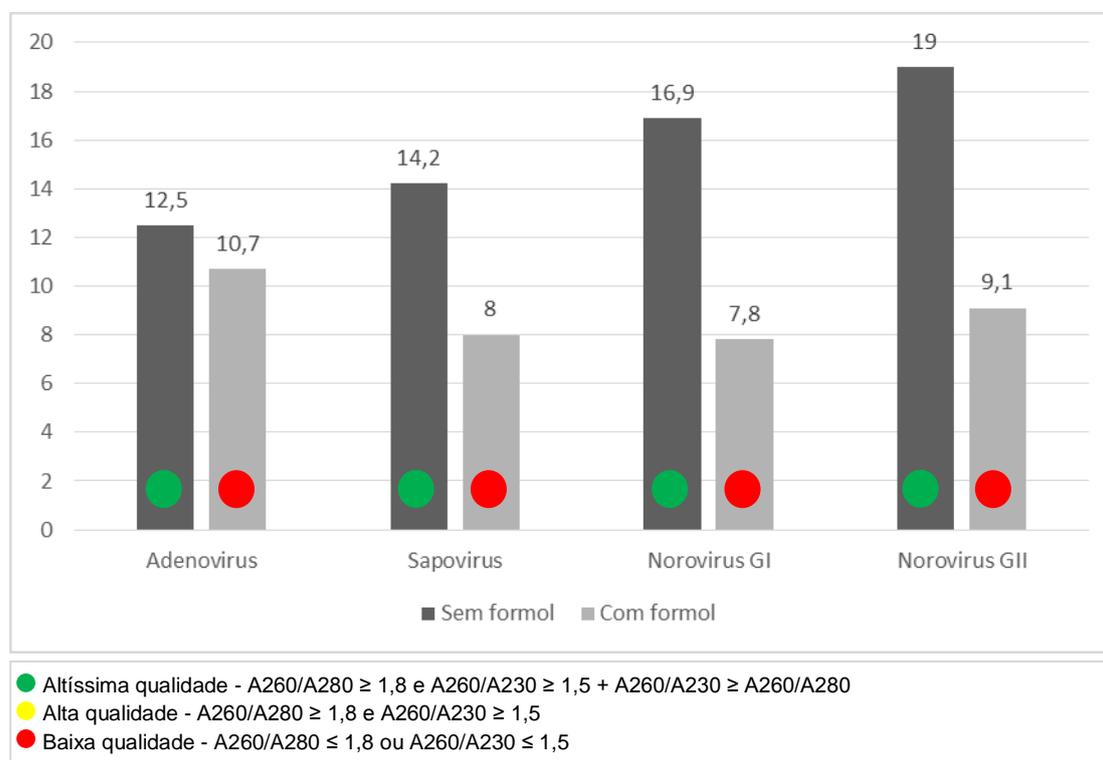


Gráfico 1: Dosagem de RNA e DNA após extração por coluna de sílica. *Unidade: ng/μL*

Exceto o Norovírus GI onde a amplificação aconteceu apenas na amostra sem formol, foi possível observar a amplificação do material

genético em gel de agarose tanto nos controles puros, quanto naqueles que continham a formalina (Figura 7).

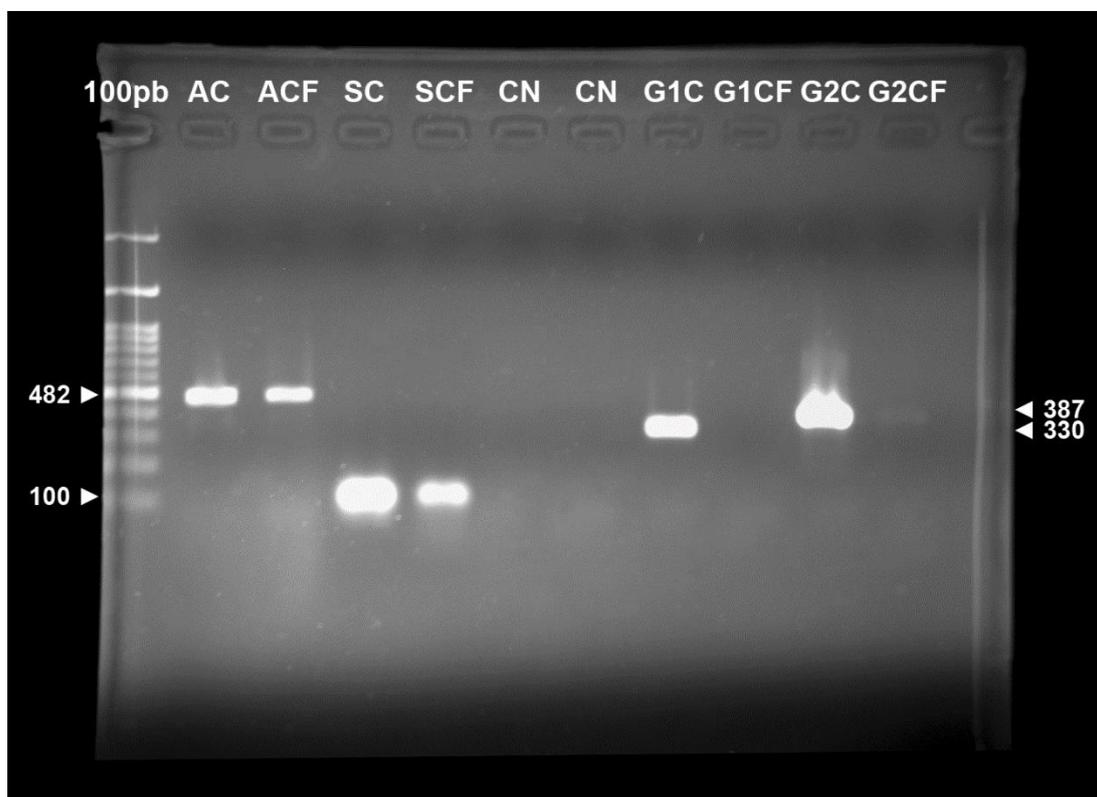


Figura 7 | Gel de agarose da primeira rodada de extrações utilizando a coluna de sílica. **Legenda:** AC: Adenovírus coluna; ACF: Adenovírus coluna com formol; SC: Sapovírus coluna; SCF: Sapovírus coluna com formol; CN: controle negativo com e sem formol; G1C: Norovírus G1 coluna; G1CF: Norovírus G1 coluna com formol; G2C: Norovírus GII coluna; G2CF: Norovírus GII com formol.

5.2. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

No segundo teste, 300µL de cada um dos controles com formol foi submetido à extração do material genético utilizando a metodologia automatizada por *microbeads* magnéticas com ou sem a adição de *RNA-Carrier* e pelo método de coluna de sílica.

Pelo método de *microbeads* utilizando *RNA-Carrier* antes da precipitação dos ácidos nucleicos, foi possível recuperar uma quantidade

maior de RNA em todos os controles testados. Também é possível notar que a adição do *RNA-Carrier* não impactou a recuperação de DNA, uma vez que os valores obtidos nas dosagens para Adenovírus pelo método de *microbeads*, independente da adição de *RNA-Carrier* ou não, mantiveram-se próximos. A extração por coluna de sílica recuperou menos material que ambas às metodologias automatizadas por *microbeads* magnéticas (Gráfico 2).

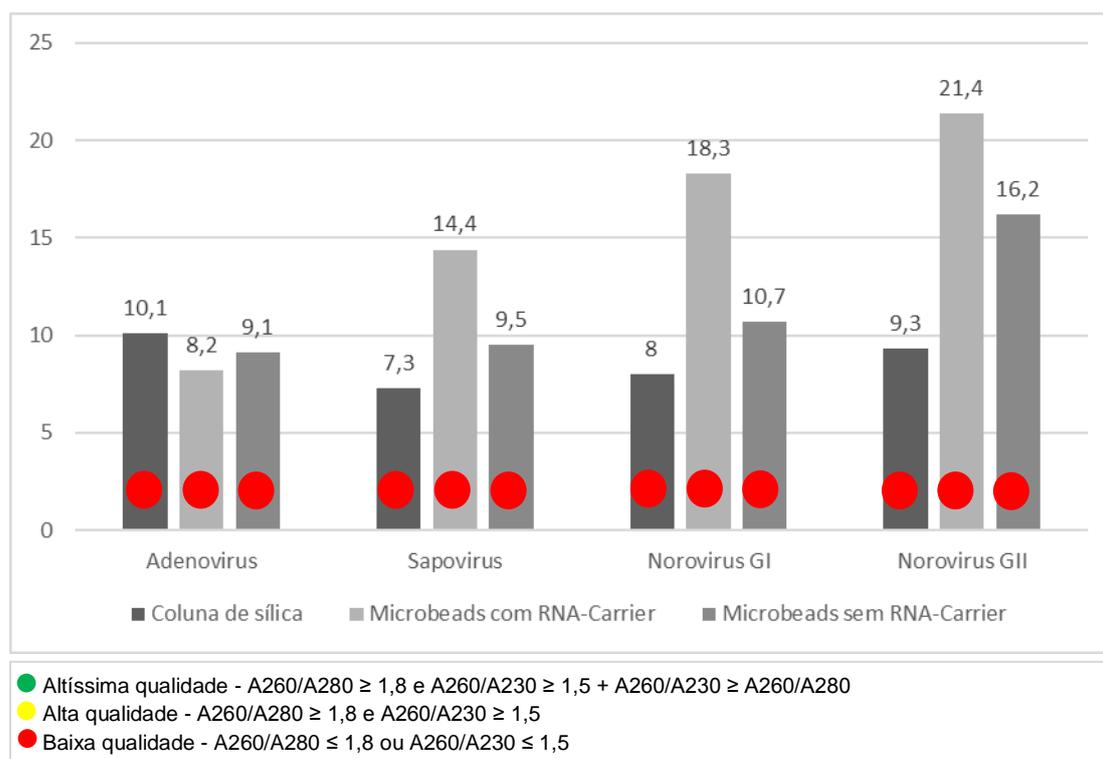


Gráfico 2: Dosagem de RNA e DNA após extração de 300µL de amostras com formalina. *Unidade: ng/µL*

5.3. COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE DNA UTILIZADO COMO TEMPLATE PARA O PCR - 25µg/mL

Para padronizar a quantidade de material genético nas reações, utilizamos 25µg/mL de DNA como *template* para as PCRs, nesse caso, foi possível verificar a amplificação dos Adenovírus e Sapovírus em todas as

metodologias utilizando o formol; com Norovírus GI somente foi possível amplificar o vírus quando a extração foi realizada com *microbeads* magnéticas e adição de *RNA-Carrier*. O Norovírus GII foi amplificado quando utilizada a metodologia por coluna de sílica e *microbeads* sem *RNA-Carrier* (Figura 8).

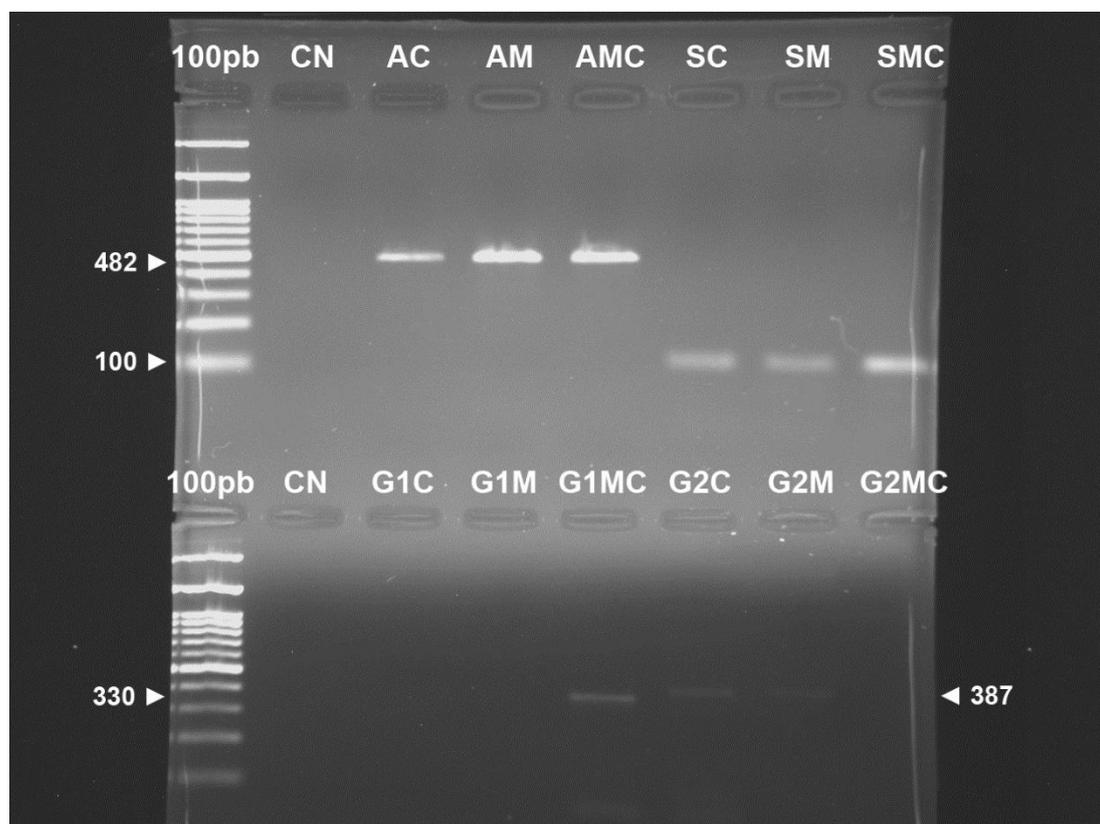


Figura 8: Gel de agarose 1,5%, PCR com controles a 25µg/mL. **Legenda:** Comparativo de extração de controles com formol por coluna de sílica, *microbeads* com *RNA-Carrier* e *microbeads* sem *RNA-Carrier* com 25ug de DNA ou cDNA por mL. CN: controle negativo; AC: *HAdV* coluna, AM: *HAdV* *microbeads*, AMC: *HAdV* *microbeads* com *RNA-Carrier*, SC: *SaV* coluna, AM: *SaV* *microbeads*, AMC: *SaV* *microbeads* com *RNA-Carrier*, G1C: *NoVG1* coluna, G1M: *NoVG1* *microbeads*, G1MC: *NoVG1* *microbeads* com *RNA-Carrier*, G2C: *NoVGII* coluna, G2M: *NoVGII* *microbeads*, G2MC: *NoVGII* *microbeads* com *RNA-Carrier*

Utilizando 25µg/mL de DNA como *template*, nas amostras extraídas pela metodologia de *microbeads* com *RNA-Carrier* a quantidade de material

genético amplificado foi maior em comparação às outras metodologias, em especial com o Sapovírus. A única exceção foi o *NoVGII* em que houve quantificação maior de DNA na amostra que foi extraída por coluna. Não houve diferença significativa na quantificação de DNA dos *HAdV* extraídos pelas diferentes técnicas (Gráfico 3). A pureza do material genético manteve-se baixa em todos os testes (Gráfico 3).

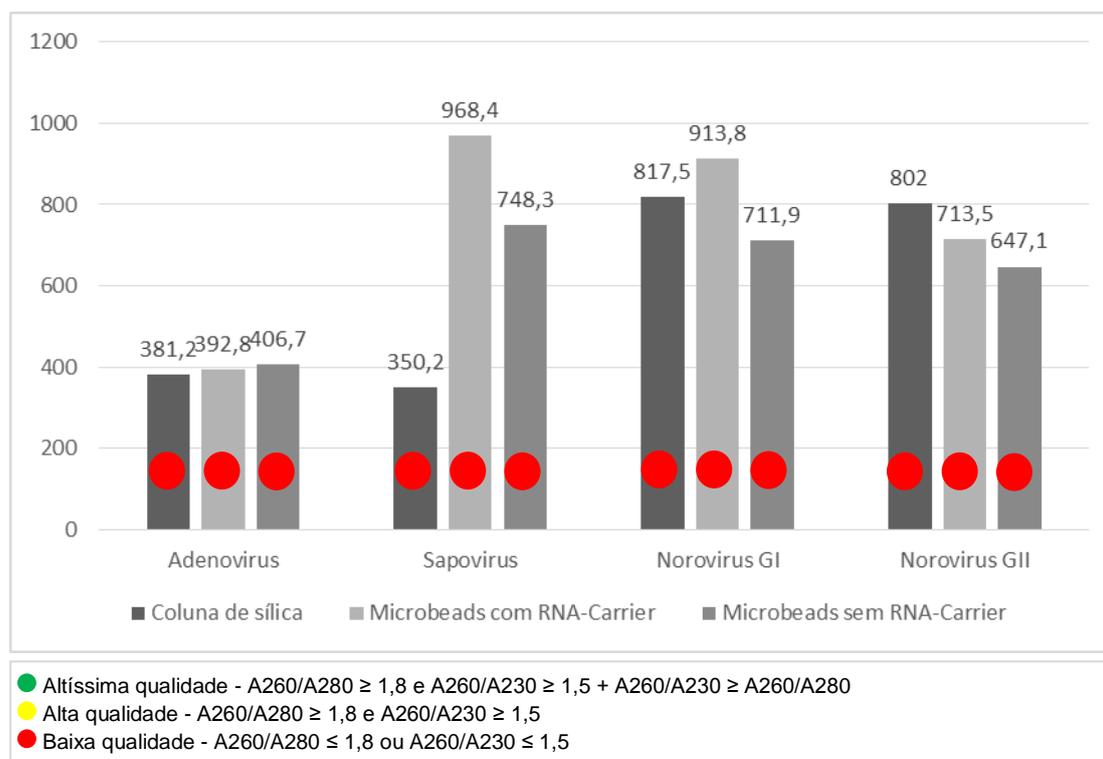


Gráfico 3: Dosagem de produto de PCR com 25ng/μL de DNA como molde.
Unidade: ng/μL

5.4. COMPARAÇÃO ENTRE A QUANTIDADE DE DNA UTILIZADO COMO TEMPLATE PARA O PCR - 50μg/mL

Verificada a negatividade no gel de agarose em alguns testes feitos com 25μg/mL de DNA, aumentamos a quantidade de material para 50μg/mL de DNA como *template* para o PCR na tentativa de verificar se a negatividade era reflexo de material genético insuficiente, foi possível então

verificar, em gel de agarose, a amplificação de *HAdV* e *SaV* em todas as metodologias testadas com formol; somente na extração com coluna de sílica foi possível amplificar o material genético do *NoVGI*; o produto de extração do *NoVGI* foi amplificado por PCR tanto na metodologia de coluna de sílica quanto na extração por *microbeads* com *RNA-Carrier* (Figura 9).

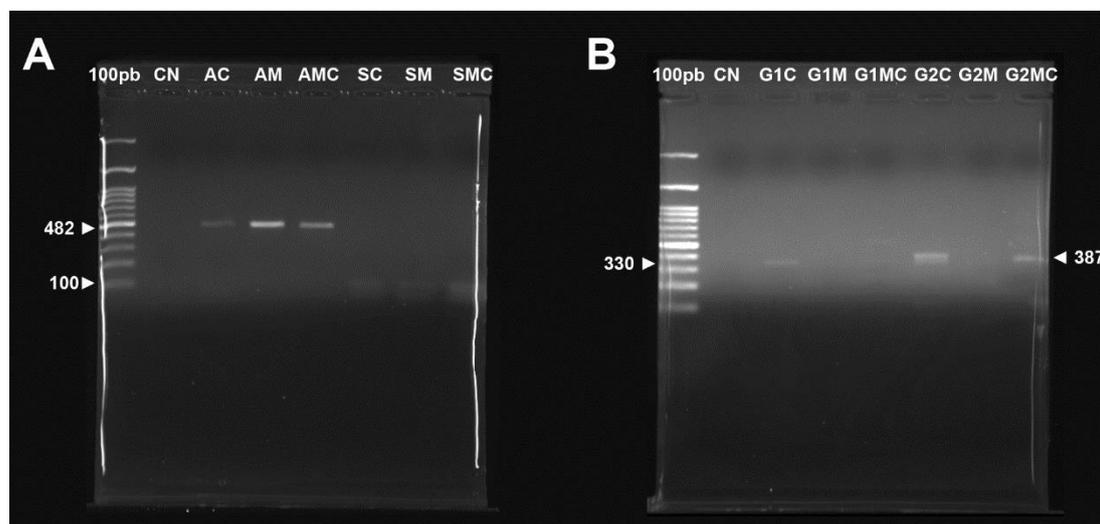


Figura 9: Gel de agarose 1,5%, PCR com controles a 50 μ g/mL. **Legenda:** Comparativo de extração de controles com formol por coluna de sílica, *microbeads* com *RNA-Carrier* e *microbeads* sem *RNA-Carrier* com 50 μ g de DNA ou cDNA por mL. GEL A: CN: controle negativo; AC: *HAdV* coluna, AM: *HAdV microbeads*, AMC: *HAdV microbeads* com *RNA-Carrier*, SC: *SaV* coluna, AM: *SaV microbeads*, AMC: *SaV microbeads* com *RNA-Carrier*. GEL B: CN: controle negativo; G1C: *NoVGI* coluna, G1M: *NoVGI microbeads*, G1MC: *NoVGI microbeads* com *RNA-Carrier*, G2C: *NoVGII* coluna, G2M: *NoVGII microbeads*, G2MC: *NoVGII microbeads* com *RNA-Carrier*.

De modo geral, com 50 μ g/mL, a quantidade de DNA amplificado pelo PCR foi menor que a quantidade obtida com 25 μ g/mL. A quantificação de material genético amplificado para o Adenovírus manteve-se estável independente da técnica utilizada. Em quase todos os testes realizados, o grau de pureza do material amplificado, foi maior que o material obtido da amplificação utilizando 25 μ g/mL como *template* para a PCR (Gráficos 3 e 4).

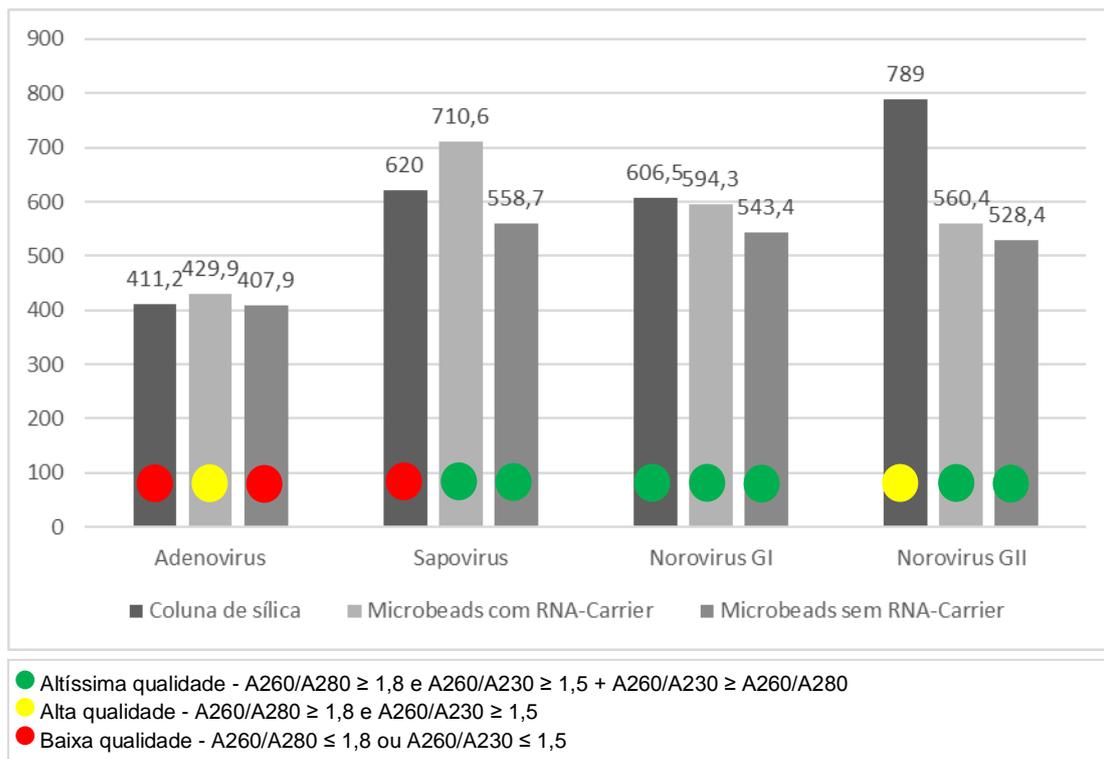


Gráfico 4: Dosagem de produto de PCR com 50 μ g/mL de DNA como molde.
 Unidade: ng/ μ L

Comparando todas as metodologias e quantidades de DNA utilizadas como *template* para as PCRs, a única técnica capaz de detectar todos os vírus alvos de nossos testes foi a extração por coluna de sílica utilizando 50 μ g/mL de DNA (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação da recuperação do amplicon de acordo com a metodologia

Vírus	Coluna de Sílica 25µg/mL	<i>Microbeads</i> sem <i>RNA-Carrier</i> 25µg/mL	<i>Microbeads</i> com <i>RNA-Carrier</i> 25µg/mL	Coluna de Sílica 50µg/mL	<i>Microbeads</i> sem <i>RNA-Carrier</i> 50µg/mL	<i>Microbeads</i> com <i>RNA-Carrier</i> 50µg/mL
Sapovírus	+	+	+	+	+	+
Adenovírus	+	+	+	+	+	+
Norovírus GI	-	-	+	+	-	-
Norovírus GII	+	+	-	+	-	+

5.5. DETECÇÃO DOS VÍRUS EM FEZES

Um vírus de DNA (Adenovírus) e um vírus de RNA (Sapovírus) foram adicionados a fezes frescas e posteriormente essa mistura adicionada a coletores contendo formalina tamponada a 10%.

Essas amostras foram submetidas ao método de extração que obteve mais êxito (coluna de sílica e PCR com 50µg/mL de DNA ou cDNA) e novamente foi possível detectar ambos os vírus (Figura 10).

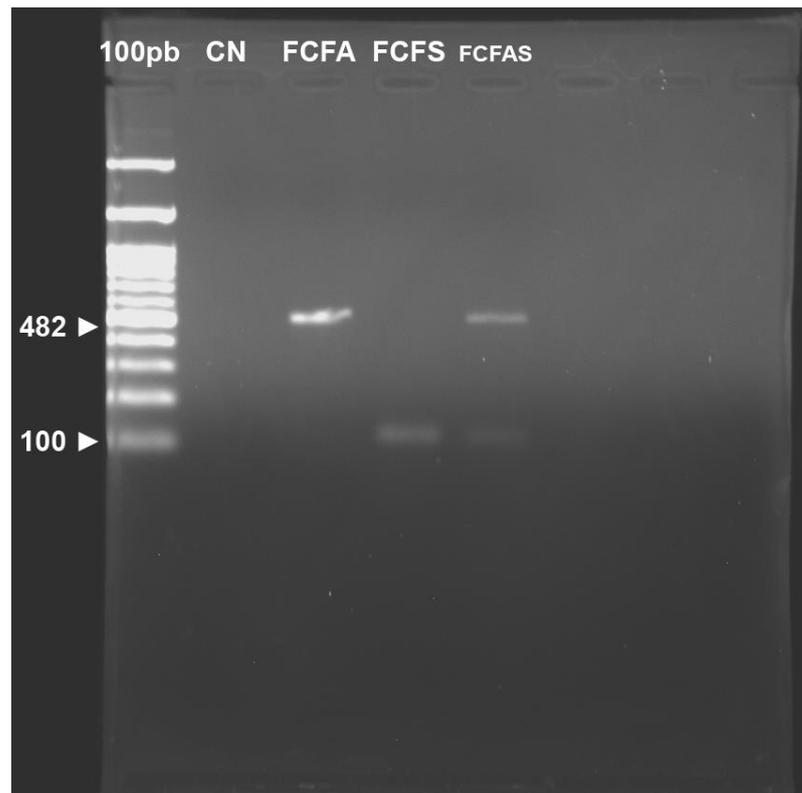


Figura 10: Fezes frescas adicionadas de controles positivos em seguida de formalina a 10%. **Legenda:** Extração em coluna de sílica e PCR com controles a 50µg/mL. CN: controle negativo; FCFA: fezes em coluna com formol *HAdV*; FCFS: fezes em coluna com formol *SaV*; FCFAS: fezes em coluna com formol *HAdV* e *SaV*.

6. DISCUSSÃO

A adição de formalina como um conservante em amostras de fezes pode levar a uma grande dificuldade na detecção dos vírus gastroentéricos, fazendo com que não haja garantias de que um resultado de detecção molecular é realmente negativo ou sua negatividade é reflexo do efeito deletério do formol (falso negativo). O atual estudo comparou diferentes metodologias de recuperação de material genético de vírus gastroentéricos em fezes conservadas em formol, demonstrando que é possível detectar estes vírus nessas amostras a partir do aprimoramento das técnicas de extração. Um estudo realizado por Whittier no ano de 2005 buscou comparar a recuperação de RNA de Rotavírus de macacos rhesus de amostras de fezes preservadas em diferentes meios, incluindo a formalina. Fora este, há uma escassez de estudos focados em amostras biológicas embebidas em formalina. Se tratando de fezes para a recuperação de vírus o estudo de Whittier se torna único, além do mais, o foco dos experimentos não é a interferência do formol em si, mas os diferentes meios de preservação.⁶⁸

Devido à natureza única do experimento, as comparações aqui realizadas estão baseadas na recuperação de material genético, seja DNA ou RNA de amostras de diversos tecidos e órgãos humanos fixados com formalina ou a recuperação de material genético de agentes virais de outros tecidos ou fluidos biológicos humanos.

Em nosso laboratório, realizamos testes preliminares que mostraram que o período ideal para detecção dos vírus testados, em especial os Norovírus, é o máximo de 24 horas de contato da amostra com o formol. Por esse motivo, este período de conservação foi escolhido para a incubação das amostras antes da realização dos testes. Um estudo canadense observou que em amostras humanas fixadas com formol, a recuperação de material genético era extremamente mais eficiente quando a extração da amostra acontecia em um período inferior a 24 horas de contato do espécime com a formalina.⁶⁹

Para comparar o efeito da formalina tamponada nas amostras testadas, adicionamos o conservante às amostras e comparamos a extração dos ácidos nucleicos para verificar a quantidade de material recuperado e sua viabilidade. Para tal, utilizamos a extração por coluna de sílica como ponto de partida. Observamos queda significativa na quantidade de material genético extraído em todas as amostras contendo formol, em especial nos vírus de RNA, mais especificamente nos Norovírus. Notadamente, houve uma queda drástica na pureza do material extraído das amostras que continham formol. Esse achado está em conformidade com o estudo feito por Turashvili em 2012 onde observaram uma queda drástica na pureza de material genético devido à presença do formol.⁶⁹

Três métodos de extração diferentes foram utilizados para comparação da eficiência dessas técnicas para recuperação de ácidos nucleicos em amostras conservadas em formol. Foi demonstrado que a utilização de carreadores de RNA favorece a recuperação do material genético nas amostras em que o formol foi adicionado. Os carreadores de RNA são pequenas sequências de RNA que têm, em biologia molecular, essencialmente duas funções: a primeira delas é garantir que a precipitação dos ácidos nucleicos ocorra de forma mais eficiente; e a segunda é diminuir a possibilidade de ação de nucleases, uma vez que esses RNA carreadores ocupam o sítio de ligação dessas proteínas.^{70, 71} O carreador que utilizamos é um tRNA de levedura e além das duas funções básicas citadas, tem a capacidade de auxiliar na maior adesão de ácidos nucleicos à matriz de sílica da coluna de extração. Segundo o fabricante do carreador utilizado no presente estudo, o uso de *Carrier* está indicado para aquelas amostras em que a quantidade de ácidos nucleicos recuperado está abaixo de 20µg/mL, valores condizentes com o que obtivemos.^{70, 71} Mesmo observando que a extração com *microbeads* recuperou mais RNA que a extração por coluna de sílica, a adição de *RNA-Carrier* ao método de *microbeads*, aumentou de forma considerável a quantidade de RNA recuperado das amostras adicionadas de formol para as amostras de RNA. Obviamente, não houve diferença relevante entre os métodos quanto à recuperação de DNA. Outro

estudo avaliou se a adição de *RNA-Carrier* às amostras antes da extração de ácidos nucleicos utilizando-se de *microbeads* teria algum impacto na recuperação do material genético do Vírus Sincicial Respiratório (RSV) e dos Adenovírus do grupo F (*HAdV-F*). Foi demonstrado que a utilização de *RNA-Carrier* na extração aumentou tanto a quantidade de RNA quanto de DNA quando comparados à técnica sem a adição de *RNA-Carrier*. O carreador utilizado para a detecção desses vírus respiratórios foi do tipo poly-A, o que talvez justificasse a discrepância entre a recuperação do DNA do presente estudo, uma vez que cada tipo de carreador apresenta diferente afinidade a diferentes ácidos nucleicos.⁷² Em linha com os resultados obtidos um estudo com amostras humanas fixadas com formalina demonstrou que a quantificação de mRNA era maior nas amostras em que antes da extração de RNA total foi adicionado *RNA-Carrier*.⁷³

Iniciamos a tentativa de detecção com 25µg/mL de DNA como *template* para o PCR, observamos que não foi possível detectar *NoVGI* extraído pelo método de *microbeads* sem a adição de *Carrier*, tampouco pelo método de coluna de sílica. Hipotetizamos que o motivo por não ocorrer a amplificação foi a quantidade insuficiente de cópias do genoma alvo no cDNA total adicionado ao mix do PCR (apesar do presente estudo não quantificar a carga viral). Com o aumento da quantidade de cDNA foi possível detectar uma banda correspondente ao *NoVGI* pelo método de coluna de sílica o que poderia confirmar nossa hipótese. Porém, mesmo com o aumento da quantidade de cDNA utilizada como *template* (50µg/mL), não foi possível detectar *NoVGI* no teste feito após extração pelo método de *microbeads* sem a adição de *Carrier*. Além disso, utilizando 50µg/mL também não foi possível detectar o *NoVGI* no teste feito após extração pelo método de *microbeads* com a adição de *Carrier*. Nota-se que neste caso o *NoVGI* foi detectado quando se utilizou menores quantidades de cDNA.

Também observamos a influência da quantidade de cDNA na detecção de *NoVGII*. Com o aumento da quantidade de cDNA utilizada como *template* (50µg/mL), não foi possível detectar *NoVGII* no teste feito após extração pelo método de *microbeads* com *Carrier*, tampouco pelo

método de *microbeads* sem *Carrier*, assim como já havia sido demonstrado para *NoVGI*. Nota-se que o *NoVGII* foi detectado após extração com *microbeads* com e sem *Carrier* com 25µg/mL de cDNA. Assim, tanto para o *NoVGI* e *NoVGII* a quantidade de cDNA não parece ser o fator limitante na amplificação nas técnicas com *microbeads*, independente da adição ou não de *Carrier*. Já para a amplificação destes dois vírus após a extração pela técnica de coluna de sílica, a quantidade de cDNA parece ser um fator importante, uma vez que o *NoVGI* somente foi detectado após adição de 50µg/mL e o *NoVGII* apresentou uma amplificação melhor (banda mais intensa).

Os Adenovírus e Sapovírus foram positivos em todos os métodos testados independente da concentração de DNA e da metodologia de extração de ácidos nucleicos utilizada.

Embora as quantificações dos produtos de PCR tenham sido inferiores com uma concentração de 50µg/mL de DNA em comparação com o experimento a 25µg/mL, o produto de PCR tinha um nível de pureza superior com a concentração mais alta. O grau de pureza do material genético dosado em equipamentos que usam a espectrofotometria é definido por duas razões de absorbâncias. A primeira razão é entre 260nm e 280nm, quando esta razão está próxima a 1.8 considera-se que o grau de pureza do DNA é alto; a segunda razão é entre 260nm e 230nm, quando a razão é de 1.5 ou superior, considera-se que o material genético dosado tem alto grau de pureza, quando essa razão é superior a razão A260/A280 o material dosado está no maior padrão de pureza possível. A observação de valores de A260/A280 inferiores a 1.8 e de A260/A230 inferiores a 1.5 indicam contaminação do material sendo dosado por componentes ácidos ou básicos, proteínas, excesso de dNTPs e ou oligonucleotídeos, dentre outros contaminantes.^{74, 75}

Assim, hipotetizamos que a concentração de cDNA é um fator importante a depender do método utilizado para a extração, o que faz o PCR ocorrer de forma mais eficiente, utilizando de forma mais adequada os oligonucleotídeos e dNTPs presentes na reação. De um modo geral, apesar

da concentração de DNA do produto de PCR ter sido maior com 25µg/mL de DNA como *template*, isso se deve possivelmente a presença de dNTPs e oligonucleotídeos não utilizados na reação, em contrapartida as dosagens obtidas com 50µg/mL apesar de inferiores, indicaram material com maior grau de pureza, ou seja, as quantificações obtidas eram de fato o material genético do vírus o que nos indicaria uma PCR mais eficiente com 50µg/mL. Porém, o fato de haver quantificação no *NanoDrop*TM, mas não haver amplicon nos géis em alguns dos testes realizados pode ter relação com alguns fatores específicos: i) as fezes apresentam um ambiente com altos níveis de nucleases e severos pHs; ii) a presença do formol que por si só já é um interferente da capacidade da Taq Polimerase;^{76, 77, 78}

Para a positividade dos Sapovírus, estudo anterior demonstrou que a formalina afeta a capacidade catalítica da Taq Polimerase; amplicons menores são mais facilmente recuperados que amplicons de tamanhos superiores a 350pb, o que é refletido na detecção do vírus que possui um amplicon de apenas 100pb.⁷³ Os Adenovírus também foram positivos em todos os testes, sabidamente o DNA tem características físico-químicas que garantem maior estabilidade à molécula que ao RNA, a ausência de um grupo hidroxila no carbono 2' torna a molécula de DNA muito mais sensível que a de RNA em condições extremas como as condições em que está exposto diante do formol.^{69, 73, 77, 78}

A metodologia capaz de detectar todos os vírus foi a extração por coluna de sílica com PCR realizado com 50µg/mL de DNA. Foi demonstrado que quando amostras humanas fixadas em formalina eram submetidas a uma remoção do excesso do composto em uma etapa prévia à extração, a taxa de recuperação do fragmento de RNA de interesse ocorre em 71,42% dos testes realizados. Quando essa remoção não é realizada não é possível recuperar o RNA nativo de interesse em 100% dos casos. O método utilizado para retirada do excesso de formol foi sucessivas lavagens da amostra utilizando colunas de filtração feitas de membrana de celulose que retém a parte sólida e particulada na porosidade do filtro e descarta a fase líquida onde se encontra o formol.⁶³

Na extração realizada por coluna de sílica ocorre um processo semelhante. Após a precipitação dos ácidos nucleicos, todo o conteúdo fica retido na membrana de sílica contida no microtubo e toda a fase líquida onde está contido o formol é descartada em sucessivas lavagens com um tampão a base de etanol. Em seguida, a amostra sofre uma nova centrifugação que a seca e finalmente o produto de extração é eluído da sílica com água livre de nucleases. Acreditamos que a retirada do excesso do formol colaborou para que a técnica demonstrasse eficiência superior a observada em ambos os testes com *microbeads* magnéticas, que apesar de ser um método de concentração dos ácidos nucleicos, não submete a amostra a lavagens sucessivas, como na extração por coluna de sílica.

Observamos que foi possível amplificar dois tipos virais (Sapovírus e Adenovírus) após esses espécimes serem inoculados artificialmente em fezes frescas, que posteriormente foram colocadas em formalina tamponada a 10%, situação mais próxima da realidade. Um estudo prévio avaliou a formalina tamponada a 10% como um meio para conservação de amostras de fezes de gorila semeadas com uma alta carga viral de Rotavírus de macacos Rhesus (RRV). A detecção molecular após extração por coluna de sílica demonstrou que foi possível, em alguns casos, detectar as partículas virais em até 180 dias. Curiosamente ambas as amostras positivas após 180 dias foram negativas nos testes feitos com 70 dias de armazenamento, o que poderia ter sido falha de metodologia (má homogeneização das amostras antes dos processos de extração realizados).⁶⁸

No presente estudo também foi possível recuperar amplicons de dois dos vírus testados em amostras semeadas com controle positivo e acondicionadas em formol. Contudo, somente avaliamos a recuperação viral após 24 horas de semeio. Existem algumas outras diferenças entre os estudos que podem justificar tais resultados: i) o kit de extração utilizado no estudo do outro grupo possui um protocolo específico para extração de amostras de fezes, descrito pelo próprio fabricante em seu site; ii) o *RNA-carrier* utilizado no kit é do tipo poly-A e não tRNA como o utilizado no presente estudo; iii) as amostras foram acondicionadas a temperatura

ambiente e não a 8°C + ou – 2°C; iv) e o mais importante, a carga viral adicionada às amostras foi controlada e em grande quantidade.⁷¹ No presente estudo não foi possível determinar a quantidade de partículas virais que estava sendo manipulada e nem adicionada a amostra negativa, o que também pode justificar os resultados negativos obtidos nos outros experimentos realizados.

O presente trabalho tem algumas limitações. A primeira delas é que não há uma dosagem da carga viral presente em cada uma das amostras. Até o ano de 2016 o Norovírus humano não podia ser cultivado. Recentemente foi publicado o primeiro estudo de replicação bem-sucedida de Norovírus em cultura de enterócitos. Nesse estudo foi possível cultivar o vírus em um meticuloso processo utilizando enterócitos derivados de células tronco humanas.⁷⁹

Outro fator a ser considerado é a limitação da dosagem feita por absorbância realizada pelo *NanoDrop*TM. O equipamento não é capaz de distinguir entre material genético, oligonucleotídeos e dNTP, uma vez que leva em consideração somente a absorbância. Caso a amostra não estiver pura e/ou o protocolo de transcrição reversa e/ou o PCR estiverem bem afinados, as dosagens obtidas pelo equipamento podem ser erráticas, ainda que as razões de absorbâncias sejam um parâmetro que indica o grau de pureza do experimento. Assim, a quantidade de material calculado em cada uma das reações pode não ter de fato a quantidade de DNA que deveria ter.^{74,75,80}

O qPCR ou Nested PCR, por exemplo, seriam ferramentas mais robustas e com maior sensibilidade para a detecção viral em comparação ao PCR convencional e a corrida das amostras em gel de agarose, talvez algumas das amostras negativas no presente estudo pudessem apresentar-se positivas utilizando uma das técnicas citadas.⁸¹

Os controles positivos utilizados são provenientes de amostras clínicas das quais não possuímos informações como idade, sexo, comorbidade, presença de sintomas ou infecção assintomática, e diversas outras variáveis que poderiam impactar de alguma maneira a carga viral

presente nas amostras, além da presença de outros microrganismos do trato gastrointestinal desses indivíduos que estão presentes na amostra e poderiam gerar diversos tipos de interferência nas técnicas utilizadas em nosso trabalho, em especial na transcrição reversa em que utilizamos oligonucleotídeos randômicos. O ideal seria a utilização apenas do vírus e em quantidade controlada, porém, os vírus testados não são cultiváveis ou necessitam de metucioso processo de cultivo que aumenta demasiadamente o custo da pesquisa.

Outro ponto foi a utilização de apenas uma amostra para cada um dos vírus, na ausência da possibilidade de utilizar apenas os vírus para a realização dos testes, acrescentar mais amostras positivas para cada um dos vírus daria mais robustez e poder estatístico ao estudo, mas amostras positivas para esses patógenos não são fáceis de encontrar em grande volume.

7. CONCLUSÃO

Todos os métodos, de alguma forma, se mostraram eficientes e capazes de recuperar ácidos nucleicos de amostras de fezes humanas conservadas em formalina tamponada 10%, porém, considerando todos os vírus avaliados, a extração por coluna de sílica utilizando 50µg/mL de DNA como *template* foi o método com melhor desempenho. Por outro lado, a quantidade de material genético recuperado na extração com a técnica de *microbeads* magnéticas é superior nas quantificações obtidas em comparação às obtidas pela técnica por coluna de sílica.

A adição de RNA-Carrier tRNA demonstrou ser capaz de aumentar consideravelmente a quantidade de material genético recuperado durante o processo de extração. Não somente a eficiência da extração deve ser levada em consideração para a detecção dos microrganismos testados, mas também deve haver preocupação com a quantidade de material genético que está sendo adicionado ao tubo de reação para servir como *template*.

É de suma importância que métodos sejam comparados na tentativa de buscar a padronização de técnicas para que tenham aplicabilidade clínica. Os laboratórios de saúde pública do DF não possuem uma rotina implantada para inquéritos epidemiológicos, contudo, o Laboratório Central de Saúde Pública do DF o faz. Estudos que demonstram a eficácia de algum teste, norteiam a escolha de métodos para a implementação na rotina clínica ainda que a detecção desses vírus tenha finalidade epidemiológica e de tomada de condutas profiláticas uma vez que não há tratamento específico para os quadros desencadeados pelos patógenos.

No presente estudo três metodologias de extração foram comparadas para a detecção de quatro vírus gastroentéricos que são importantes causadores de quadros de gastroenterite, dentre elas uma se mostrou mais eficaz, tem custo mais baixo em comparação ao método de *microbeads* magnéticas e pode ser uma importante ferramenta para a utilização de amostras biológicas que tendem a ser descartadas em inquéritos

epidemiológicos devido a sua não conformidade pela adição de formol. A não investigação dessas amostras impacta em resultados subestimados de incidência e prevalências desses agentes virais.

Outros passos devem ser dados com o intuito de demonstrar a robustez dessa técnica, a diminuição dos vieses supracitados é um passo importante para verificar e consolidadas as possibilidades abertas por estes testes iniciais. O presente estudo demonstra que é possível detectar vírus gastroentéricos de amostras de fezes conservadas em formalina e que esse tipo de amostra é elegível para inquéritos epidemiológicos.

8. ANEXOS

Tabela A1: Dosagem de RNA e DNA após extração por coluna de sílica

Vírus	Sem Formol	Com Formol
Sapovírus	11 ng/μL	8 ng/μL
Adenovírus	13,2 ng/μL	10,7 ng/μL
Norovírus G1	12,4 ng/μL	7,8 ng/μL
Norovírus GII	19 ng/μL	9,1 ng/μL

Tabela A2: Dosagem de RNA e DNA após extração de 300μL de amostras com formalina

Vírus	Coluna de sílica	Microbeads com RNA-Carrier	Microbeads sem RNA-Carrier
Sapovírus	8,2 ng/μL	14,4 ng/μL	9,1 ng/μL
Adenovírus	10,1 ng/μL	7,3 ng/μL	7,5 ng/μL
Norovírus G1	8 ng/μL	18,3 ng/μL	10, ng/μL
Norovírus GII	9,3 ng/μL	21,4 ng/μL	16,2 ng/μL

Tabela A3: Dosagem de produto de PCR com 25μg/mL de DNA como molde

Vírus	Coluna de Sílica	Microbeads com RNA-Carrier	Microbeads sem RNA-Carrier
Sapovírus	350.2 ng/μL	968.4 ng/μL	748.3 ng/μL
Adenovírus	381.2 ng/μL	392.8 ng/μL	406.7 ng/μL
Norovírus G1	817.5 ng/μL	913.8 ng/μL	711.9 ng/μL
Norovírus GII	802.0 ng/μL	713.5 ng/μL	647.1 ng/μL

Tabela A4: Dosagem de produto de PCR com 50µg/mL de DNA como molde

Vírus	Coluna de Sílica	Microbeads com RNA-Carrier	Microbeads sem RNA-Carrier
Sapovírus	620.0 ng/µL	710.6 ng/µL	558.7 ng/µL
Adenovírus	411.2 ng/µL	407.9 ng/µL	429.9 ng/µL
Norovírus G1	606.5 ng/µL	594.3 ng/µL	543.4 ng/µL
Norovírus GII	789.0 ng/µL	560.4 ng/µL	528.4 ng/µL

Tabela A5: Nível de pureza do produto de extração por coluna de sílica em amostras sem formol e com formol (F). Níveis de absorbância.

Vírus	A260/A280	A260/A230	QUALIDADE
Sapovírus	1.92	1.96	●
Sapovírus F	1.34	1.01	●
Adenovírus	1.84	1.86	●
Adenovírus F	1.25	1.11	●
Norovírus G1	1.90	1.91	●
Norovírus G1 F	1.12	1.00	●
Norovírus GII	1.93	1.95	●
Norovírus GII F	1.41	1.21	●

- Altíssima qualidade - A260/A280 ≥ 1,8 e A260/A230 ≥ 1,5 + A260/A230 ≥ A260/A280
- Alta qualidade - A260/A280 ≥ 1,8 e A260/A230 ≥ 1,5
- Baixa qualidade - A260/A280 ≤ 1,8 ou A260/A230 ≤ 1,5

Tabela A6: Nível de pureza do produto de extração pelos três métodos com formol. Níveis de absorbância.

Vírus	A260/A280	A260/A230	QUALIDADE
Adenovírus C	1.20	1.01	
Adenovírus M	1.30	0,75	
Adenovírus MC	1.62	0.95	
Sapovírus C	1.17	1.07	
Sapovírus M	1.14	0,69	
Sapovírus MC	1.13	0.68	
Norovírus GI C	1.21	0.99	
Norovírus GI M	1.10	1.00	
Norovírus GI MC	1.09	1.01	
Norovírus GII C	1.08	0.55	
Norovírus GII M	1.16	0.77	
Norovírus GII MC	1.09	0.89	

● Altíssima qualidade - $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ e $A_{260}/A_{230} \geq 1,5$ + $A_{260}/A_{230} \geq A_{260}/A_{280}$
 ● Alta qualidade - $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ e $A_{260}/A_{230} \geq 1,5$
 ● Baixa qualidade - $A_{260}/A_{280} \leq 1,8$ ou $A_{260}/A_{230} \leq 1,5$

Tabela A7: Nível de pureza do produto de PCR com 25µg/mL. Níveis de absorvância.

Vírus	A260/A280	A260/A230	QUALIDADE
Adenovírus C	1.77	1.40	
Adenovírus M	1.77	1.15	
Adenovírus MC	1.77	1.10	
Sapovírus C	1.75	1.63	
Sapovírus M	1.75	1.72	
Sapovírus MC	1.76	1.80	
Norovírus GI C	1.77	1.99	
Norovírus GI M	1.77	1.97	
Norovírus GI MC	1.77	1.21	
Norovírus GII C	1.76	1.23	
Norovírus GII M	1.78	1.90	
Norovírus GII MC	1.75	1.86	

● Altíssima qualidade - A260/A280 ≥ 1,8 e A260/A230 ≥ 1,5 + A260/A230 ≥ A260/A280
● Alta qualidade - A260/A280 ≥ 1,8 e A260/A230 ≥ 1,5
● Baixa qualidade - A260/A280 ≤ 1,8 ou A260/A230 ≤ 1,5

Tabela A8: Nível de pureza do produto de PCR com 50µg/mL. Níveis de absorvância.

Vírus	A260/A280	A260/A230	QUALIDADE
Adenovírus C	1.78	1.61	Baixa qualidade
Adenovírus M	1.79	1.75	
Adenovírus MC	1.80	1.75	Alta qualidade
Sapovírus C	1.74	1.70	Baixa qualidade
Sapovírus M	1.81	1.94	Altíssima qualidade
Sapovírus MC	1.80	1.95	
Norovírus GI C	1.80	1.90	
Norovírus GI M	1.80	1.86	
Norovírus GI MC	1.80	1.91	
Norovírus GII C	1.80	1.68	
Norovírus GII M	1.80	1.89	Alta qualidade
Norovírus GII MC	1.80	1.88	Altíssima qualidade

● Altíssima qualidade - $A260/A280 \geq 1,8$ e $A260/A230 \geq 1,5$ + $A260/A230 \geq A260/A280$
● Alta qualidade - $A260/A280 \geq 1,8$ e $A260/A230 \geq 1,5$
● Baixa qualidade - $A260/A280 \leq 1,8$ ou $A260/A230 \leq 1,5$

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World health organization, O.M.S. 1. Diarrhoea. [Online]. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/> [Acessado em 01 abril 2019].
2. Thévenot J, Etienne-Mesmin L, Denis S, Chalancon S, Alric M, Livrelli V et al. Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Survival in an In Vitro Model of the Human Large Intestine and Interactions with Probiotic Yeasts and Resident Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;79(3):1058-1064.
3. Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, Caramello S, Tarasco V, Savino F. Diarrheagenic Escherichia coli in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy. *New Microbiol*. 2011;34(1): 45-51.
4. Iijima Y, Tanaka S, Miki K, Kanamori S, Toyokawa M, Asari S. Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic Escherichia coli in stool specimens: low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007;58(3):303-308.
5. Monteiro AFM, De oliveira viana J, Junior FJB, et al. Recent Theoretical Studies Concerning Important Tropical Infections. *Curr Med Chem*. 2019.
6. Pedraza DF. Hospitalization for infectious diseases, parasitism and nutritional evolution of children attended in public child day care centers. *Cien Saude Colet*. 2017;22(12):4105-4114.
7. Glass R.I, Bresee J, Jiang B, Ando T, Fankhauser R, Noel J. Gastroenteritis viruses: an overview. *Nov Foun Symp*. 2005;238: 5-19.

8. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
9. Rotavirus - ViralZone page. 2019. Rotavirus - ViralZone page. [ONLINE] Disponível em: https://viralzone.expasy.org/107?outline=all_by_species. [Acessado em 8 de março de 2019].
10. Aliabadi N, Parashar U, Tate J, Haynes A. Sustained Decrease in Rotavirus Activity After Implementation of Rotavirus Vaccines Through the National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System (NREVSS) - United States, 2000-2015. *Open Forum Infectious Diseases*. 2015;2(suppl_1).
11. Rocha-pereira J, Van dycke J, Neyts J. Norovirus genetic diversity and evolution: implications for antiviral therapy. *Curr Opin Virol*. 2016;20:92-98.
12. Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, Dolin R, Chanock RM, Kapikian AZ. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis*. 1977;135(1):20-7.
13. Estes MK, Prasad BV, Atmar RL. Noroviruses everywhere: has something changed? *Curr Opin Infect Dis* 2006;19(5):467–74.
14. Karst SM. Pathogenesis of Noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses* 2010;2(3):748–81.
15. CDC Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel–Afghanistan, May 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51(22):477–9.

16. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. Clin Microbiol Rev. 2015;28(1):134-64.
17. Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino F, Kojima S et al. Coexistence of Multiple Genotypes, Including Newly Identified Genotypes, in Outbreaks of Gastroenteritis Due to Norovirus in Japan. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42(7):2988-2995.
18. Hoa Tran T, Trainor E, Nakagomi T, Cunliffe N, Nakagomi O. Molecular epidemiology of Noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. Journal of Clinical Virology. 2013;56(3):269-277.
19. Norovirus - ViralZone page. 2019. Norovirus ~ ViralZone page. [ONLINE] Available at: https://viralzone.expasy.org/194?outline=all_by_species. [Acessado em 10 de maio de 2019].
20. ORF1 - Genome polyprotein - Norwalk virus (strain GI/Human/United States/Norwalk/1968) (Hu/NV/NV/1968/US) - ORF1 gene & protein. 2019. ORF1 - Genome polyprotein - Norwalk virus (strain GI/Human/United States/Norwalk/1968) (Hu/NV/NV/1968/US) - ORF1 gene & protein. [ONLINE] Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q83883>. [Acessado em 3 de março de 2019].
21. Mcsweeney A, Davies C, Ward VK. Cell Cycle Arrest is a Conserved Function of Norovirus VPg Proteins. Viruses. 2019;11(3)
22. ORF2 - Capsid protein VP1 - Norwalk virus (strain GI/Human/United States/Norwalk/1968) (Hu/NV/NV/1968/US) - ORF2 gene & protein. 2019. ORF2 - Capsid protein VP1 - Norwalk virus (strain GI/Human/United States/Norwalk/1968) (Hu/NV/NV/1968/US) - ORF2 gene & protein.

[ONLINE]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q83884>. [Acessado em 3 de março de 2019].

23. ORF3 - Protein VP2 - Norwalk virus (strain GI/Human/United States/Norwalk/1968) (Hu/NV/NV/1968/US) - ORF3 gene & protein. 2019. ORF3 - Protein VP2 - Norwalk virus (strain GI/Human/United States/Norwalk/1968) (Hu/NV/NV/1968/US) - ORF3 gene & protein. [ONLINE] Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q83885>. [Acessado em 3 de março de 2019].

24. Rossignol JF, El-Gohary YM: Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebocontrolled clinical trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006, 24:1423-1430

25. Woodward JM, Gkrania-Klotsas E, Cordero-NG AY, Aravinthan A, Bando BN, Liu H, Davies S, Zhang H, Stevenson P, Curran MD et al.: The role of chronic Norovirus infection in the enteropathy associated with common variable immunodeficiency. *Am J Gastroenterol* 2015, 110:320-327.

26. Bull RA, White PA. Mechanisms of GII.4 Norovirus evolution. *Trends Microbiol* 2011;19(5):233–40.

27. Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, Akihara M, Horino K, Nakao T, Fukui S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home, *J Med Virol* 1979; 4:249-54

28. Pang XL, Honma S, Nakata S, Vesikari T. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl. 2):S288–94

29. Rockx B, De Wit M, Vennema H, Vinje J, De Bruin E, van Duynhoven Y, et al. Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2002;35:246–53.
30. Yamashita Y, Ootsuka Y, Kondo R, Oseto M, Doi M, Miyamoto T, et al. Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *J Med Virol* 2010;82:720–6.
31. Hall AJ, Rosenthal M, Gregoricus N, Greene SA, Ferguson J, Henao OL, et al. Incidence of acute gastroenteritis and role of Norovirus, Georgia, USA, 2004–2005. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1381–8.
32. Tam CC, Rodrigues LC, Viviani L, Dodds JP, Evans MR, Hunter PR, et al. Longitudinal study of infectious intestinal disease in the UK (IID2 study): incidence in the community and presenting to general practice. *Gut* 2012;61:69–77.
33. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17:7–15.
34. de Wit MA, Koopmans MP, van Duynhoven YT. Risk factors for Norovirus, Sapporolike virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1563–70.
35. Ueki Y, Shoji M, Okimura Y, Miyota Y, Masago Y, Oka T, et al. Detection of Sapovirus in oysters. *Microbiol Immunol* 2010;54:483–6.
36. Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, et al. Detection of multiple Sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. *Jpn J Infect Dis* 2009;62:63–6.

37. Dorland's illustrated medical dictionary, 31st ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2007; Chiba S, Nakata S, NumataKinoshita K, Honma S. Sapporo virus: history and recent findings. *J Infect Dis.* 2000;181(Suppl 2):S303–8.
38. Genome polyprotein - Sapporo virus (isolate GI/Human/Germany/pJG-Sap01) (Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE). 2019. Genome polyprotein - Sapporo virus (isolate GI/Human/Germany/pJG-Sap01) (Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE). [ONLINE] Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q672I1>. [Acessado em 05 de março de 2019].
39. ORF2 - Protein VP2 - Sapporo virus (isolate GI/Human/Germany/pJG-Sap01) (Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE) - ORF2 gene & protein. 2019. ORF2 - Protein VP2 - Sapporo virus (isolate GI/Human/Germany/pJG-Sap01) (Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE) - ORF2 gene & protein. [ONLINE] Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q672H9>. [Acessado em 05 de março de 2019].
40. ORF3 - Uncharacterized protein VP3 - Sapporo virus (isolate GI/Human/Germany/pJG-Sap01) (Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE) - ORF3 gene & protein. 2019. [ONLINE]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q672I0>. [Acessado em 05 de março de 2019].
41. Oka T, Mori K, Iritani N, Harada S, Ueki Y, Iizuka S, et al. Human Sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Arch Virol* 2012;157:349–52.
42. Sapovirus - ViralZone page. 2019. Sapovirus - ViralZone page. [ONLINE] Disponível em: https://viralzone.expasy.org/196?outline=all_by_species. [Acessado em 05 de março de 2019].

43. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;84(3):570-3.
44. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
45. Wold WSM, Horwitz MS. Adenoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007:2395–2436
46. Muzyczka N, Warrington KH Jr. Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism. *Hum Gene Ther* 2005;16:408–416.
47. Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-fauquier A. Viruses causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(4):247-62.
48. Sanaei dashti A, Ghahremani P, Hashempoor T, Karimi A. Molecular Epidemiology of Enteric Adenovirus Gastroenteritis in under-Five-Year-Old Children in Iran. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:2045697.
49. Adenovirus | Clinical Overview | CDC. 2019. Adenovirus | Clinical Overview | CDC. [ONLINE] Disponível em: <https://www.cdc.gov/Adenovirus/hcp/clinical-overview.html>. [Acessado em 05 de março de 2019].
50. Adenoviridae ~ ViralZone page. 2019. Adenoviridae ~ ViralZone page. [ONLINE] Disponível em: https://viralzone.expasy.org/4?Outline=all_by_species. [Acessado em 8 de abril de 2019].

51. Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):3-31.
52. Clark SD, Sidlak M, Mathers AJ, Poulter M, Platts-mills JA. Clinical Yield of a Molecular Diagnostic Panel for Enteric Pathogens in Adult Outpatients With Diarrhea and Validation of Guidelines-Based Criteria for Testing. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(4):ofz162.
53. De grazia S, Bonura F, Pepe A, et al. Performance evaluation of gastrointestinal viral ELite panel multiplex RT-PCR assay for the diagnosis of rotavirus, Adenovirus and astrovirus infection. *J Virol Methods.* 2019;268:48-52.
54. Yimer M, Hailu T, Mulu W, Abera B. Evaluation performance of diagnostic methods of intestinal parasitosis in school age children in Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2015;8:820.
55. Mengist HM, Demeke G, Zewdie O, Belew A. Diagnostic performance of direct wet mount microscopy in detecting intestinal helminths among pregnant women attending ante-natal care (ANC) in East Wollega, Oromia, Ethiopia. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):276.
56. Baptista A.B, Ramos I.S, Santos H.A.G. Prevalência de enteroparasitos e aspectos epidemiológicos de crianças e jovens do município de Altamira – PA. *Rev. Pesq. Saúde.* 2013;14(2):77-80.
57. Silva-moraes V, Shollenberger LM, Siqueira LMV, et al. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas?. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2019;114:e180478.
58. Costa JO, Resende JA, Gil FF, Santos JFG, Gomes MA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* and other enteral parasitic diseases in the

metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. A cross-sectional study. Sao Paulo Med J. 2018;136(4):319-323.

59. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Capacitação em monitorização das doenças diarreicas agudas – MDDA: manual do monitor. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. [ONLINE] Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/capacitacao_monitoramento_diarreicas_monitor. Acessado em 6 de março de 2019.

60. Brasil. Secretaria de Estado de Saude do Paraná. Superintendência de Vigilância em Saúde. Protocolo estadual da monitorização das doenças diarreicas agudas – MDDA. Centro de Epidemiologia, Divisão de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Curitiba: Editora do Ministério da Saúde, 2015. [ONLINE] Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/PROTOCOLOMDDAFINAL2018>. Acessado em 6 de março de 2019.

61. Brasil. Secretaria de Estado de Saude de São Paulo. Coordenadoria de controle de doenças. Monitorização das doenças diarreicas agudas. Centro de vigilância epidemiológica, Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar. – São Paulo: Editora do Ministério da Saúde, 2008. [ONLINE] Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilanciaepidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/2008/2008_manual_mdda.pdf. Acessado em 6 de março de 2019.

62. Karmakar S, Harcourt EM, Hewings DS, et al. Organocatalytic removal of formaldehyde adducts from RNA and DNA bases. Nat Chem. 2015;7(9):752-8.

63. Evers DL, Fowler CB, Cunningham BR, Mason JT, O'leary TJ. The effect of formaldehyde fixation on RNA: optimization of formaldehyde adduct removal. *J Mol Diagn.* 2011;13(3):282-8.
64. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(22):4436-43.
65. Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S, Sugiyama T, Ogawa O, Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular-weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathol Res Pract.* 1993;189(1):66-72.
66. Campos PF, Gilbert TM. DNA extraction from formalin-fixed material. *Methods Mol Biol.* 2012;840:81-5.
67. Khamrin P, Okame M, Thongprachum A, et al. A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. *J Virol Methods.* 2011;173(2):390-3.
68. Whittier CA, Horne W, Slenning B, Loomis M, Stoskopf MK. Comparison of storage methods for reverse-transcriptase PCR amplification of rotavirus RNA from gorilla (*Gorilla g. gorilla*) fecal samples. *J Virol Methods.* 2004;116(1):11-7.
69. Turashvili G, Yang W, Mckinney S, et al. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol.* 2012;92(1):33-43.

70. PureLink™ Viral RNA/DNA MiniKit. 2018 [ONLINE] Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12280050> [Acessado em 3 de março de 2019].
71. QIAamp® Viral RNA Mini Handbook 2014. [ONLINE] Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Mohamed_Mourad_Lafifi/post/Any_suggestion_for_an_RNA_extraction_robot/attachment/59d6478379197b80779a259a/AS%3A462732475539461%401487335427617/download/HB-0354003-1090245-HB-QA-Viral-RNA-Mini-1214-WW.pdf. [Acessado em 3 de março de 2019].
72. He H, Li R, Chen Y, et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Sci Rep.* 2017;7:45199.
73. Andreasen D, Fog JU, Biggs W, et al. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods.* 2010;50(4):S6-9.
74. Understanding and measuring variations in DNA sample quality | Articles | Oxford Gene Technology. 2019. [ONLINE] Disponível em: https://www.ogt.com/resources/literature/483_understanding_and_measuring_variations_in_dna_sample_quality. [Acessado em 20 de maio de 2019].
75. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers | 260/280 and 260/230 Ratios | Natural History Museum. 2019. [ONLINE] Disponível em: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> [Acessado em 20 de maio de 2019].

76. Mamedov TG, Pienaar E, Whitney SE, et al. A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Comput Biol Chem.* 2008;32(6):452-7.

77. Dietrich D, Uhl B, Sailer V, et al. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e77771.

78. Yamada M, Funaki S, Miki S. Formaldehyde interacts with RNA rather than DNA: Accumulation of formaldehyde by the RNA-inorganic hybrid material. *Int J Biol Macromol.* 2019;122:168-173.

79. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human Noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science.* 2016;353(6306):1387-1393.

80. He HJ, Stein EV, Derose P, Cole KD. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. *BioTechniques.* 2018;64(2):59-68.

81. Xia Z, Johansson ML, Gao Y, et al. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. *Ecol Evol.* 2018;8(23):11799-11807.