



**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO  
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
DO CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)**

**BRUNA LINDOLFO DA SILVA**

**BOTUCATU - SP  
2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO UTILIZANDO  
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA  
DO CIRCOVÍRUS SUÍNO (PCV)**

**BRUNA LINDOLFO DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Campus de Botucatu, Unesp, para  
obtenção do título de Mestre no Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia

Orientador: **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior**

Coorientadoras: **Dra. Caroline Rodrigues Basso**

**Dra. Taís Fukuta da Cruz**

BOTUCATU – SP  
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Bruna Lindolfo da.

Padronização de protocolo utilizando partículas magnéticas para extração de DNA do Circovírus suíno (PCV)  
/ Bruna Lindolfo da Silva. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João Pessoa Araújo Junior  
Coorientador: Caroline Rodrigues Basso  
Coorientador: Taís Fukuta da Cruz  
Capes: 90400003

1. DNA. 2. Ácidos nucleicos. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Partículas. 5. Circovírus.

Palavras-chave: DNA; Extração de ácido nucleico; PCR quantitativa (qPCR).; PCV; Partículas magnéticas.

## **Dedicatória**

As minhas avós, **Sebastiana Carlota** (In  
memoriam) e **Francisca Timóteo**, pelos  
propósitos que me impulsionaram até aqui. Com  
amor e saudades.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, **Rosalvo** e **Sandra**, pelo imenso apoio e carinho. As minhas irmãs **Renata** e **Natália** e cunhados, **Pitágoras** e **Raphael**, por sempre se fazerem presentes mesmo tão longe (e de outro lado do mundo). Aos meus sobrinhos queridos, **Ana**, **Benjamim** e **Nicolas** pelas constantes mensagens de carinho. O carinho e o apoio de todos foi minha principal motivação!

Aos meus sogros **Mary** e **Francisco**, por serem os principais apoiadores. Ao meu namorado **Cassio**, por todo amor e companheirismo. Agradeço por sempre me incentivarem e apoiarem, em todos os momentos da minha vida. Devo tudo a vocês!

Aos meus amigos: **Bárbara**, **Maria Gabriela**, **Mayra Fernanda**, **Laís Cristina**, **Natália Boracine** e **Murilo**, pelo carinho e incentivo. Por me apoiarem em todos os momentos. Sou imensamente grata por ter vocês!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior** por toda compreensão, pelas oportunidades, incentivo e ensinamentos os quais permitiram a conclusão desse trabalho e de minha evolução profissional. Sou grata por fazer parte do seu grupo de pesquisa!

Às minha co-orientadoras e amigas, **Dra. Caroline Rodrigues Basso** e **Dra. Taís Fukuta da Cruz**, por estarem sempre presentes auxiliando-me em todo o processo experimental desenvolvido nesse trabalho, além da amizade construída. Agradecendo especialmente a **Carol** por todos os momentos descontraídos e de muito aprendizado no Departamento de Química os quais sinto muitas saudades. À **Taís**, pela orientação ter ido além da pós-graduação, com a vivência no LAD-COVID, por todos os momentos divertidos e pelo apoio nos momentos de maior dificuldade.

À **Ana Carolina Yamakawa**, pela amizade e grande colaboração nesse trabalho. Por ter sido sempre presente, com ajuda na seleção de amostras, execução do protocolo e análise por qPCR.

Ao **Prof. Dr. Fábio Sossai Possebon** pela amizade e colaboração em todas as fases deste trabalho, principalmente nas análises estatísticas realizadas. Em especial, por todo apoio e auxílio no LAD-COVID.

À **Dra. Camila Dantas Malossi**, pela amizade e auxílio constante na experimentação desse trabalho. Por ajudar na seleção das amostras, por fornecer os insumos necessários para a realização da qPCR. E também, por todos os momentos vivenciados no LAD-COVID.

À **Profª. Dra. Leila Sabrina Ullmann** pela amizade e colaboração na conclusão desse trabalho. Por todas as contribuições que foram fundamentais para a evolução desse projeto. Além de todo auxílio e companheirismo no LAD-COVID.

Aos meus amigos da Virologia: **Amanda Haisi, Amanda Laurindo, Evelyn Cristine, Jaqueline Assunção, Jéssica Bindo, Larissa Baldo** e do ViriCan: **Bryan Sayed e Felipe Biggi**, por toda amizade e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho. Pelos “bolinhos e cafés”, troca de ensinamentos e amizade. Essa trajetória foi muito mais alegre com vocês!

Ao **Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa** pela oportunidade de desenvolver meu primeiro projeto em seu laboratório, por todos os ensinamentos e ajuda. E aos **funcionários** do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp – Botucatu.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Unesp-Botucatu, em especial ao **Cristiano** por toda ajuda com os materiais e companheirismo no LAD-COVID.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** e aos coordenadores do curso.

Ao financiamento concedido pela **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001 e **Fundibio** pela concessão de bolsa.

**E a todos que de forma direta ou indiretamente fizeram parte desse projeto. Meus sinceros agradecimentos!**

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de execução manual do protocolo de extração desenvolvido. ....29
- Figura 2.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtidos por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de coluna (Coluna). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....37
- Figura 3.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....37
- Figura 4.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....38
- Figura 5.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue total submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de coluna (Coluna). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....38
- Figura 6.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue total submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....39
- Figura 7.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....39
- Figura 8.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....40
- Figura 9.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit

comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores $p < 0,05$ indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....	40
<b>Figura 10.</b> Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores $p < 0,05$ indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos.....	41
<b>Figura 11.</b> Gráfico de distribuição da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR de amostras de PCV por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns .....	41
<b>Figura 12.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns .....	42
<b>Figura 13.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns.....	43
<b>Figura 14.</b> Comparação entre os procedimentos manual e automático sobre a concentração de DNA do PCV obtida por qPCR por tipo de amostra e execução do protocolo desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon .....	44
<b>Figura 15.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e execução do protocolo desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon .....	45
<b>Figura 16.</b> Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de salivas, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis.....	46
<b>Figura 17.</b> Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de sangue total, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis.....	47



<b>Figura 18.</b> Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de soro, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis.....	48
<b>Figura 19.</b> Gráfico de distribuição da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR de amostras de PCV por tipo de amostra e protocolo de extração desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon.....	49
<b>Figura 20.</b> Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e tipo de protocolo desenvolvido (in house). Considerada diferença estatística (*) $p < 0,05$ entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon .....	50
<b>Figura 21.</b> Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva, do puro até o ponto $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição.....	51
<b>Figura 22.</b> Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva, com seis pontos (amostra pura até diluição $10^{-6}$ ) .....	52
<b>Figura 23.</b> Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva .....	52
<b>Figura 24.</b> Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total, do puro até o ponto $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição.....	53
<b>Figura 25.</b> Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total, com seis pontos (amostra pura até diluição $10^{-6}$ ) .....	54
<b>Figura 26.</b> Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total .....	54
<b>Figura 27.</b> Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro, do puro até o ponto $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição.....	55
<b>Figura 28.</b> Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro, com seis pontos (amostra pura até diluição $10^{-6}$ ).....	56
<b>Figura 29.</b> Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro.....	56

## ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Grupos amostrais.....	27
<b>Quadro 2.</b> Adaptações avaliadas do protocolo desenvolvido ( <i>in house</i> ).....	32
<b>Quadro 3.</b> Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de sangue.....	35
<b>Quadro 4.</b> Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de soro.....	36
<b>Quadro 5.</b> Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de saliva.....	36
<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados para produção do tampão GITC.....	23
<b>Tabela 2.</b> Reagentes utilizados para produção do tampão eluição.....	24

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Circovírus suíno (PCV) .....	15
2.2 Metodologias de extração de DNA.....	17
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
3.1 Objetivos específicos .....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Reagentes e Enzima .....	21
4.2 Equipamentos.....	22
4.3 Amostras biológicas.....	22
4.4 Soluções utilizadas no protocolo .....	23
4.4.1 Preparação das partículas magnéticas.....	23
4.4.2 Tampão GITC.....	23
4.4.3 Tampão eluição.....	24
4.5 Delineamento experimental .....	24
4.5.1 Piloto.....	24
4.5.2 Protocolo de extração de DNA do PCV utilizando partículas magnéticas carboxiladas em amostras de sangue total (POSSEBON et al., 2022).....	24
4.5.3 Modificações do protocolo Possebon et al. (2022) .....	25
4.5.4 Avaliação do volume de partículas magnéticas adequado para extração de DNA do PCV 26	
4.5.5 Avaliação do protocolo proposto em amostras de soro e saliva para extração de DNA do PCV.....	26
4.6 Padronização do protocolo proposto para extração de DNA do PCV .....	26
4.6.1 Extração de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido .....	27
4.6.2 Extração de DNA do PCV utilizando kit EasyPure®Blood Genomic DNA KIT 30	
4.6.3 Extração de DNA do PCV utilizando kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit .....	30
4.7 Otimização do protocolo desenvolvido para extração de DNA do PCV .....	31
4.7.1 Extração automatizada de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido....	31
4.7.2 Avaliação dos parâmetros de lavagem .....	32
4.8 Curva de eficiência .....	32
<b>5. ANÁLISES</b> .....	<b>33</b>
5.1 Detecção e quantificação do PCV por qPCR.....	33

5.2	Análise de pureza e quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria UV-vis	33
5.3	Forma de análises dos resultados .....	33
<b>6.</b>	<b>RESULTADO .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1</b>	<b>Análise do piloto .....</b>	<b>34</b>
<b>6.2</b>	<b>Análise da padronização .....</b>	<b>36</b>
<b>6.3</b>	<b>Análise da otimização.....</b>	<b>44</b>
<b>6.4</b>	<b>Curva de eficiência .....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>65</b>

## Resumo

O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial de exportação de carne suína e para alcançar tais índices zootécnicos, os produtores necessitam do controle de várias doenças emergentes em suínos, sendo a identificação e prevenção fatores essenciais. Dentre as principais doenças, destaca-se a circovirose suína, tendo o circovírus suíno 2 (PCV-2) como agente etiológico. O diagnóstico da circovirose suína se dá por meio dos sinais clínicos associados a testes laboratoriais. A utilização da PCR quantitativa (qPCR) para a determinação da concentração do DNA viral vem sendo considerada o método de escolha neste contexto devido ao alto poder de detecção e na rapidez para obtenção dos resultados. Entretanto, a aplicabilidade desta técnica a torna problemática, devido ao alto custo para a aquisição dos insumos. Um dos principais fatores associados ao elevado custo é a utilização de kits comerciais para extração do ácido nucleico. Grande parte desses insumos são adquiridos pela importação, o que além de refletir no aumento do valor devido a logística, podem ocasionar problemas na produção devido a fatores externos como alta demanda e falta de matéria prima. Com isso, este trabalho teve como objetivo padronizar uma metodologia simples para a extração de DNA, a fim de proporcionar a otimização das análises moleculares para o diagnóstico do PCV em diferentes amostras. O protocolo desenvolvido foi aplicado em amostras de saliva, sangue total e soro de suínos infectados naturalmente. Os produtos das extrações utilizando o protocolo desenvolvido foram submetidas às análises de qPCR para a quantificação do DNA do PCV. Adicionalmente, a análise de integridade do ácido nucleico pela espectrofotometria UV-Vis foi realizada para obtenção dos dados de pureza do material extraído. Dois kits comerciais, um baseado na metodologia de extração por coluna de sílica e o outro por partículas magnéticas, foram utilizados a fim de comparar a eficiência do protocolo proposto. Os protocolos desenvolvidos neste trabalho apresentaram eficiência similar aos kits comerciais para a extração de DNA do PCV para os três tipos de amostras. Todos os protocolos de extração adotados apresentaram baixa pureza em relação às razões 260/280 e 260/230, porém tal fato não interferiu na análise por qPCR. Fatores como simplicidade de execução e possibilidade de automação favorecem a sua utilização.

**Palavras-chaves:** PCV, DNA, extração de ácido nucleico, partículas magnéticas, PCR quantitativa (qPCR).

## Abstract

Brazil occupies the fourth position in the world ranking of pork exports, and to reach such zootechnical indexes, producers need to control several emerging diseases in swine, being the identification and prevention essential factors for this. Among the main diseases, presenting Porcine circovirus 2 (PCV-2) as the etiological agent. The diagnosis of porcine circovirus diseases (PCVD) occurs through clinical signs associated with laboratory tests. The use of quantitative PCR (qPCR) to determine the concentration of viral DNA has been considered the method of choice in this context due to the high power of detection and the speed to obtain the results. However, the applicability of this technique makes it problematic, due to the high cost of acquiring the inputs. One of the main factors associated with the high cost is the use of commercial kits for nucleic acid extraction. Most of these inputs are acquired through imports, which, in addition to reflecting in the increase in value due to logistics, can cause problems in production due to external factors such as high demand and lack of raw material. Thus, this work aimed to standardize a simple methodology for DNA extraction, in order to provide the optimization of molecular analyzes for the diagnosis of PCV in different samples. The developed protocol was applied to saliva, whole blood and serum samples from naturally infected pigs. The products of the extractions using the protocol developed were submitted to qPCR analysis to quantify the PCV DNA. Additionally, nucleic acid integrity analysis by UV-Vis spectrophotometry was performed to obtain data on the purity of the extracted material. Two commercial kits, which used the extraction methodology by silica column and the other by magnetic particles, were used in order to compare the efficiency of the proposed protocol. The protocol developed in this work showed efficiency similar to commercial kits for PCV DNA extraction in serum and saliva samples. All protocols adopted showed low purity in relation to the 260/280 and 260/230 ratios, but this fact did not interfere with the qPCR analysis. Factors such as simplicity of execution and possibility of automation favor its use.

**Keywords:** PCV, DNA, nucleic acid extraction, magnetic particles, quantitative PCR (qPCR).

## 1. INTRODUÇÃO

A circovirose suína é uma das principais enfermidades da suinocultura industrial, sendo responsável pelos maiores prejuízos na criação e exploração de suínos no Brasil e no mundo. Tendo como agente etiológico o circovírus suíno 2 (PCV-2 - “porcine circovirus 2”), disseminado ao redor do mundo e associado a diversas enfermidades denominadas de doenças associadas ao circovírus suíno (PCVAD) ou doenças do circovírus suíno (PCVD).

De forma geral, dentre os animais infectados pelo PCV-2 uma grande parte apresenta infecção subclínica. Na ocorrência de sinais clínicos, a síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) é a mais importante manifestação clínica, caracterizada por palidez da pele, dificuldade respiratória, diarreia e icterícia (ocasionalmente), além de imunossupressão decorrente do acometimento de órgãos linfoides. Por ausência de sinais patognomônicos, o diagnóstico das PCVAD mostra-se uma tarefa complexa, principalmente em animais sem manifestação clínica.

Assim, destaca-se a importância do manejo adequado das granjas através da vacinação e monitoramentos dos animais. Com isso, a técnica de PCR quantitativa (qPCR) vem sendo empregada atualmente a fim de acompanhar as granjas de produção industrial. A técnica permite a análise a partir de diversas amostras com alta sensibilidade e valores equivalentes ao alto número de cópias do genoma viral podem sugerir importância na saúde do animal e do plantel, além da identificação de infecção subclínica.

Além da técnica de qPCR para o diagnóstico das PCVAD, a utilização de outras metodologias moleculares como o sequenciamento de DNA é empregada a fim de monitorar e compreender os mecanismos do PCV-2 e sua epidemiologia molecular. E para tais aplicações, a obtenção do material genético do vírus, como também, a metodologia utilizada para sua extração são pontos cruciais. Há um alto custo relacionado com a execução dessas metodologias, em sua maioria, associados aos valores exorbitantes de equipamentos e insumos necessários.

A utilização de kits comerciais para extração de ácido nucleico é um exemplo. A maioria desses insumos são adquiridos através de importação, o que além de refletir no aumento do valor devido à logística, podem ocasionar em problemas em sua produção por conta de fatores externos como alta demanda e falta de matéria prima. Além disso, muitos protocolos comerciais necessitam de equipamentos específicos para sua execução,

como microcentrífugas e homogeneizadores automáticos, que por sua vez acabam aumentando o custo da análise.

Sendo assim, reforça-se a importância do aprimoramento em relação às metodologias de extração de DNA a fim de garantir acessibilidade ao monitoramento e diagnóstico do PCV-2 através da técnica de qPCR em granjas comerciais, objetivando simplicidade, baixo custo, rapidez e qualidade.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Circovírus suíno (PCV)

O Circovírus Suíno (PCV – “Porcine circovirus”) foi identificado pela primeira vez por Tischer et al., em 1974, a partir das análises de partículas esféricas contaminantes em culturas celulares de rim de suíno PK-15 (ATCC CCL 33), onde foi observada a morfologia circular de seu genoma (TISHER et al., 1982). Este vírus, recentemente descoberto, foi denominado “circovírus suíno” devido à presença de anticorpos “anti-PCV” estarem associadas apenas a essa espécie (TISHER et al., 1982; OPRESSING et al., 2020).

No ano de 1997, Harding descreveu a Síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (SMDS) no Canadá, com o acometimento de leitões pós-desmame que apresentavam sinais clínicos de perda de peso progressiva, problemas respiratórios e outras complicações. O novo vírus associado a esta síndrome (PCV-2 – *Porcine circovirus 2*) mostrou ser distinto antigênica e geneticamente do vírus anteriormente identificado nas culturas celulares PK-15, nomeado de circovírus suíno 1 (PCV-1 - *Porcine circovirus 1*) (ALLAN et al., 1998). O PCV-1 é considerado apatogênico para suínos (TISHER et al., 1986), entretanto o PCV-2 desde sua identificação, está associado com diversas síndromes multifatoriais denominadas de doenças associadas ao circovírus suíno (PCVAD – *Porcine Circovirus Associated Diseases*) ou doenças do circovírus suíno (PCVD - *Porcine Circovirus Diseases*) sendo considerado como um dos principais patógenos de interesse na suinocultura mundial (SEGALÉS et al., 2013).

Os circovírus suínos são subdivididos em quatro espécies de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV): PCV-1, PCV-2, PCV-3, presentes em suínos a nível global, e o recém descoberto PCV-4, cuja distribuição ainda é desconhecida (OPRESSING et al., 2020). Pertencentes à Família *Circoviridae*, Gênero *Circovirus*, sendo semelhantes em estrutura: são pequenos, com aproximadamente 17 nm de diâmetro, formato icosaedro e não envelopados. Possuem como material genético DNA de fita simples e com estrutura circular fechada covalentemente (ELLIS E ALLAN, 2000). O PCV possui dois quadros principais de leitura aberta (ORF - “Open Reading Frame”) orientados em direções opostas resultando em uma organização ambisense de seu genoma (ROSÁRIO et al., 2017).

Dentre eles, o PCV-2 possui maior destaque na literatura devido ao seu caráter patogênico e de sua alta prevalência (PATTERSON E OPRIESSNIG, 2010). Muitos

estudos relataram coinfeção com outros patógenos de suínos (vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína, vírus da influenza suína e *Mycoplasma hyopneumoniae*), como cofatores importantes que contribuem para a infecção por PCV-2 e a gravidade de PCVAD / PDVD (PALLARÉS et al., 2002; OPRIESSNIG et al., 2012).

Através de análises filogenéticas, atualmente seis genótipos do PCV-2 foram identificados (PCV-2a, PCV-2b, PCV-2c, PCV-2d, PCV-2e e PCV-2f). Estudos recentes indicaram que a evolução populacional do PCV-2 foi caracterizada pelo aparecimento de picos periódicos de diferentes genótipos, onde com o aumento de sua prevalência, o mesmo espalha-se através do mercado de suinocultura, substituindo os genótipos anteriores (FRANZO, 2016). O PCV2a e o PCV-2b encontram-se disseminados por todo o mundo (SSEMADAALI et al., 2015), inicialmente tendo predomínio do subtipo PCV2a em suínos sintomáticos de 1996 ao início dos anos 2000 (FRANZO E SEGALÉS, 2018) com a mudança para PCV2b no período de 2003 e 2006 (PATTERSON E OPRIESSNIG, 2010). Um terceiro genótipo, PCV2c foi relatado retrospectivamente na Dinamarca na década de 1980 (DUPONT et al., 2008) e posteriormente, em porcos selvagens no Brasil no ano de 2010 (FRANZO et al., 2015a) e em suínos domésticos na China (LIU et al., 2016). Entre 2010 a 2015 foi descrita a mutação deste genótipo para o PCV2d (FRANZO E SEGALÉS, 2018; XIAO et al., 2015; XIAO et al., 2016), retrospectivamente já detectado na Suíça em 1998, (XIAO, et al., 2015) o qual foi também associado a casos de suspeita de falha vacinal (XIAO et al., 2012). O PCV2e foi detectado em 2015 em amostras provenientes dos Estados Unidos e México (HARMON et al., 2015) e em 2016, Davies et al. realizaram um estudo retrospectivo identificando indícios deste subtipo em 2006 (DAVIES et al., 2016). Em 2018, pesquisadores chineses encontraram novas sequências virais agrupadas de forma distinta das existentes, classificando-as temporariamente como o genótipo PCV2f (BAO et al., 2018).

Do ponto de vista de virulência, atualmente o PCV2d é considerado semelhante aos genótipos PCV2a e PCV2b (OPRESSING et al., 2014). Já os demais subtipos (PCV2c, PCV2e e PCV2f) ainda não possuem importância clínica conhecida. Há a descrição em literatura de outros dois genótipos (PCV2g e PCV2h) identificados recentemente. No mesmo estudo propuseram a atualização de uma nova metodologia de genotipagem para classificação do PCV2 e identificação de possíveis novos genótipos (FRANZO et al., 2018), uma vez que este vírus apresenta alta taxa de substituição de nucleotídeos e a possibilidade de mutações do genoma (FIRTH et al., 2009).

O PCV2 apresenta alta resistência térmica e química, podendo permanecer viável após tratamento térmico úmido até 75°C por alguns minutos (O'DEA et al., 2008). A ausência de um envelope externo fornece certa resistência, impedindo a ação de alguns desinfetantes como aqueles à base de álcool, clorexidina, iodo e fenol (ROYER et al., 2001). Entretanto, desinfetantes alcalinos (hidróxido de sódio), agentes oxidantes (hipoclorito de sódio) e compostos de amônio quaternário podem inativá-lo (MARTIN et al., 2008). As ações de controle e prevenção da infecção pelo mesmo baseiam-se em rígidas medidas sanitárias, alimentação, manejo adequado de animais doentes e principalmente a vacinação.

A maioria das vacinas contra o PCV-2 são baseadas em antígenos do PCV2a, devido a predominância deste genótipo nos anos prévios ao desenvolvimento das vacinas (ROSE et., 2016; OPRIESSNIG et al., 2013; PARK et al., 2019; OPRIESSNIG et al., 2014). Com a persistência das PCVAD ao redor do mundo, pesquisadores associaram tal fato a atual mudança de predomínio genotípico para o PCV2d, contestando a eficácia das vacinas disponíveis. Porém, foi comprovada a existência de proteção cruzada utilizando a subunidade baseada em PCV2a contra os genótipos PCV2b e PCV2d (PARK et al., 2019).

O diagnóstico padrão das PCVAD pode ser realizado com emprego das técnicas de imunoistoquímica e hibridização *in situ*, que possibilitam uma avaliação semiquantitativa de antígenos ou DNA viral em tecidos e com a avaliação de lesões microscópicas, seguindo os critérios diagnósticos estabelecidos por Sorden (2000). A técnica de PCR quantitativa (qPCR) é empregada atualmente para detectar e quantificar cópias do PCV2 de diversas amostras (WOŻNIAK et al., 2019). Valores equivalentes a alto número de cópias do genoma viral ( $> 6 \times \log^{10}$  cópias de DNA do PCV2/mL) detectados na qPCR podem sugerir grande importância clínica (SEGALÉS, 2012).

## **2.2 Metodologias de extração de DNA**

Existem muitos protocolos de isolamento de ácidos desoxirribonucléicos (DNA) e ácidos ribonucleicos (RNA) em uma variedade de amostras. Os métodos de extração seguem alguns procedimentos comuns com o objetivo de obter o isolamento do material genético de interesse, como as etapas i) ruptura celular, ii) desnaturação de nucleoproteínas, iii) inativação de enzimas, iv) remoção de contaminantes biológicos e químicos e por fim, a v) precipitação do ácido nucleico (TAN et al., 2009). Com a padronização dessas fases de processamento, muitas empresas desenvolveram kits

comerciais que são vastamente empregados em laboratórios de biologia molecular. A escolha do método adequado de extração é de suma importância e deve levar em conta as aplicações pretendidas com o produto. Fatores como qualidade e quantidade de material genético devem ser levados em consideração. Outros fatores importantes para otimização da extração incluem o tempo, custo, toxicidade de reagentes, rendimento, equipamentos necessários, tipo e quantidade de amostra necessária para a realização do protocolo (CHACON-CORTES et al., 2014; DAIRAWAN et al., 2020).

Os métodos se diferenciam de acordo com o tipo de metodologia utilizada nos processos, sendo os mais empregados atualmente estão descritos a seguir. As extrações baseadas em cromatografia podem ser utilizadas para isolar DNA de qualquer tipo de amostra biológica com alta qualidade (CARPI et al., 2011). Este método inclui: cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), onde as moléculas são separadas a partir da diferenciação de tamanhos e forma molecular; cromatografia de troca iônica (IEC), a qual utiliza o DNA se ligando seletivamente ao grupo dietilaminoetil celulose carregado positivamente; e cromatografia de afinidade (AC), que utiliza oligo (dT) ou substâncias que formam interações altamente específicas com o ácido nucléico (PETERSON et al., 1956; CUATRECASAS et al., 1968).

O método de extração por centrifugação em gradiente de brometo de etídio (EtBr) - cloreto de cério (CsCl) é comumente utilizado para isolar DNA de bactérias, utilizando a solução de cloreto de cério e ultracentrifugação por várias horas para isolamento do ácido nucléico. O brometo de etídio é utilizado como intercalante de DNA, sinalizando sua localização para purificação do produto. Tal método possui desvantagens por sua alta complexidade, longo tempo e custo de aplicação (CSEKE et al., 2011).

A metodologia por extração alcalina é muito utilizada para isolamento de DNA de plasmídeo bacteriano (BIRNBOIM et al., 1979). Se dá através da utilização de NaOH e detergente (SDS), promovendo a lise celular e a desnaturação proteica dos constituintes na amostra. Nesta técnica há a desvantagem de ocorrer a contaminação do DNA de interesse com o material genético cromossomal, na etapa de renaturação (VOGELSTEIN et al., 1979; DAIRAWAN et al., 2020).

Extração por matriz de sílica baseia-se na ligação fortemente seletiva do DNA, negativo, com a superfície de sílica revestida por íons positivos. Através da ligação iônica, o DNA será isolado fazendo com que os contaminantes celulares sejam removidos durante o processo de lavagem (WOODARD et al., 1993). Essa metodologia é de

execução simples, rápida, econômica, com produção de DNA de alta qualidade e passível de automação (DAIRAWAN et al., 2020).

A metodologia de *salting-out* é um método de extração não tóxico que utiliza um tampão saturado de NaCl após a etapa de lise, onde a alta concentração de sal favorece a precipitação de proteínas e o DNA fica isolado no sobrenadante (PETERSON et al., 1956). Tal método produz DNA de alta qualidade comparável ao método de fenol-clorofórmio, sendo o primeiro mais eficiente devido a fatores como tempo, custo e não toxicidade dos reagentes utilizados (DOYLE, 1991).

O método considerado por muitos como padrão ouro para a extração de DNA é o de fenol-clorofórmio álcool isoamílico (PCIA) associado a um detergente (PETERSON et al., 1956), para realizar a desnaturação eficiente das proteínas. A presença do álcool evita o processo de emulsificação na amostra, facilitando a precipitação do DNA. Apesar dos benefícios desse método como alta aplicabilidade, economia e alto rendimento de DNA, a natureza tóxica dos reagentes utilizados e a necessidade do uso de capelas de exaustão são as principais limitações desse método (DAIRAWAN et al., 2020).

O método baseado em coluna de sílica é vastamente utilizado em rotinas de laboratório de biologia molecular por fornecer alto rendimento de DNA puro. Porém, a necessidade de equipamentos adicionais como microcentrífugas é a principal limitação da metodologia, devido ao elevado custo e a incapacidade do processamento de um alto número de amostras simultaneamente (OBERACKER et al., 2019).

Uma alternativa para suprir as necessidades de uma rotina laboratorial é a utilização de protocolos baseados em esferas magnéticas. O rendimento de DNA obtido por este método é similar ao obtido nas metodologias convencionais, além da rapidez de sua execução (EL-AAL et al., 2010). Os protocolos de extração de ácidos nucleicos por separação magnética são ideais para automação e requer poucos equipamentos para funcionar (DAIRAWAN et al., 2020), possibilitando o processamento de muitas amostras de uma vez. O destaque dos métodos de extração por partículas magnéticas se dá pela capacidade de ligação reversível ao ácido nucleico em condições de desidratação, podendo ser imobilizadas e manipuladas em segurança quando expostas a um campo magnético utilizando um ímã forte (OBERACKER et al., 2019).

As partículas magnéticas podem ser produzidas a partir de diversos materiais como polímeros sintéticos, biopolímeros, vidro poroso ou baseadas em materiais magnéticos inorgânicos a base de óxido de ferro como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) (BERENSMEIER, 2006). Partículas nuas, a base de óxido de ferro, possuem

propriedades de ligação direta a moléculas de DNA (DAVIES et al., 1998), porém a formação de agregados de partículas decorrente do ferrimagnetismo reduzem a área superficial para adsorção. Para garantir estabilidade e proteção das partículas magnéticas, é realizado o processo de silanização, a qual realiza a adsorção e o revestimento das partículas a partir de substâncias que serão responsáveis por realizar a interação entre o grânulo e a seu ligante (BERENSMEIER, 2006). As substâncias de superfície que podem ser usadas na modificação das partículas são sílica, grupos funcionais como hidroxila e sulfatos (SAIYED et al., 2008). Para aplicações biológicas as partículas superparamagnéticas são adequadas, devido a sua estabilidade na ausência de um campo magnético. Essas partículas possuem sua atividade sob ação de um forte campo magnético, mas não retêm magnetismo permanente quando o campo é removido (BERENSMEIER, 2006).

Os grânulos magnéticos podem ser adquiridos comercialmente ou sintetizados em laboratório. Muitos protocolos de síntese de partículas estão descritos na literatura, sendo o primeiro descrito por Ugelstad et al. (1993), a qual desenvolveram uma metodologia de produção de microesferas magnéticas constituídas de poliestireno monodimensionadas, a qual serviu de referência para muitos estudos biomédicos.

### **3. OBJETIVO**

O objetivo geral deste projeto teve como objetivo padronizar um único protocolo para a extração de DNA do PCV em diferentes amostras.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Padronização de um protocolo *in house* utilizando partículas magnéticas para extração de DNA do PCV.
- Padronização de um único protocolo para extração de DNA do PCV em amostras de saliva, sangue e soro.
- Avaliação dos parâmetros de quantidade e qualidade de DNA do PCV obtidos pelo protocolo de extração *in house*.
- Comparação da eficiência do protocolo proposto à de dois kits comerciais através dos parâmetros de quantidade e qualidade de DNA obtidos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com a colaboração das pesquisadoras: Dra. Caroline Rodrigues Basso<sup>1</sup> e Dra. Taís Fukuta da Cruz<sup>1</sup>. O protocolo proposto para extração de DNA do PCV foi baseado no protocolo desenvolvido por Possebon et al., (2022), adaptado da plataforma Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB) (OBERACKER et al., 2019), para extração de RNA e detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR em amostra de swab naso-orofaríngeo.

A metodologia utilizada na padronização do protocolo baseou-se no isolamento do ácido nucleico utilizando partículas magnéticas modificadas com carboxila. Para isso, a lise celular e desnaturação proteica foi realizada utilizando uma solução contendo um agente caotrópico, isotiocianato de guanidina (GITC). A ação desse composto químico promove alterações nas interações hidrofóbicas entre os grupos de aminoácido, enfraquecendo-as e diminuindo a estabilidade das proteínas (FERSHI, 1999), favorecendo o rompimento de membranas celulares e a liberação do material genético. A etapa de lise foi potencializada pela utilização da enzima proteinase K, a qual atuou promovendo ação contra as nucleases e auxiliando na liberação do DNA de histona. Um ponto crítico no processo de extração são as etapas de lavagem, responsáveis por remover potenciais inibidores de PCR e, ao mesmo tempo, garantir a recuperação da molécula alvo no final do processo. Sendo assim, após a liberação do ácido nucleico, o isopropanol foi utilizado por não impedir a ligação do DNA às esferas magnéticas imobilizadas através da presença de um campo magnético. Lavagens rápidas utilizando isopropanol e etanol diluído são eficientes para a remoção de vestígios celulares, GITC e outros sais, permitindo a eluição subsequente do DNA purificado (OBERACKER et al., 2019).

### 4.1 Reagentes e Enzima

Todos os produtos químicos utilizados neste estudo eram de grau analítico e não exigiam purificação adicional. Todos os tampões e soluções utilizadas nos procedimentos experimentais foram preparados utilizando água ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). As partículas magnéticas Sera-Mag<sup>TM</sup> Magnetic SpeedBeads<sup>TM</sup> Carboxylate-Modified (15 mL - 50 mg/mL) foram adquiridas da empresa GE Healthcare (Chicago, EUA), MagPrep<sup>®</sup> Silica HS (1 mL; 50 mL) foram adquiridas da empresa

---

<sup>1</sup> Pós-doutoranda do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista

Sigma Aldrich (San Luis, Missouri, EUA). Isopropanol (2-Propanol, puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur.,  $\geq 99.8\%$  (GC) 2,5 L), etanol absoluto (p.a.,  $>99,9\%$  - 1L), isotiocianato de guanidina (GITC, p.a.,  $\geq 99\%$  - 100g), N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl- p.a.,  $\geq 98.0\%$  - 5g), EDTA (0.5 M, pH 8.0, DEPC-Treated -100 mL), Tris buffer (1.0 M, pH 8.0 - 100 mL), Hidróxido de sódio (NaOH,  $\geq 98\%$ ) e Proteinase K (5 mg) foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). O antiespumante RG ALK foi adquirido da empresa Alkallis Brasil (Guarulhos, Brasil).

Os kits de extração de ácidos nucleicos comerciais EasyPure<sup>®</sup>Blood Genomic DNA KIT (TransGen Biotech CO., LTD, Beijin, China) e MagMAX<sup>™</sup> CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, EUA) foram adquiridos dos respectivos fabricantes. O kit para reação de qPCR (GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix SYBR<sup>®</sup> Green, 2X) foi adquirido da empresa Promega (Madison, EUA).

#### **4.2 Equipamentos**

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados os seguintes equipamentos: agitador automático Vórtex V-1 plus (Biosan), microcentrífuga Sorvall<sup>™</sup> Legend<sup>™</sup> Micro 17 Microcentrifuge (Thermo-Fisher, EUA), estante magnética DynaMag<sup>™</sup> -2 Magnet (Life Technologies, EUA) e termociclador em tempo real AriaMx Real-Time PCR (qPCR) Instrument (Agilent, EUA).

#### **4.3 Amostras biológicas**

Foram utilizadas amostras de saliva (n = 30), sangue total (n = 30) e soro (n = 30) de suínos provenientes de granjas do estado do Paraná/Brasil, coletadas e encaminhadas pelos respectivos responsáveis técnicos para o Serviço de Diagnóstico do Circovírus suíno, do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Unesp, campus de Botucatu. As amostras de sangue total foram enviadas em tubos de coleta a vácuo com conservante EDTA. As amostras de soro e saliva, encaminhadas em tubos de 1,5 mL sem conservantes adicionais. Foram selecionadas amostras positivas para PCV, de animais infectados naturalmente, previamente caracterizadas pela técnica qPCR. Amostras previamente caracterizadas negativas por qPCR foram selecionadas como controle negativo. As amostras foram armazenadas à  $-20^{\circ}$  C até as etapas de processamento.



## 4.4 Soluções utilizadas no protocolo

### 4.4.1 Preparação das partículas magnéticas

A partículas magnéticas Sera-Mag™ Magnetic SpeedBeads™ (GE Helthcare) foram utilizadas na concentração de 20 mg/mL, segundo Possebon et al. (2022). Para obtenção da concentração de uso foi realizada a lavagem de 1 mL da suspensão concentrada de partículas três vezes com a solução tampão TE 1X (10mM Tris-HCl 1mM EDTA Na<sub>2</sub>, pH 8,0). A rack magnética DynaMag™ -2 Magnet (Life Technologies, EUA) foi utilizada no processo de retirada do tampão original dos grânulos e as lavagens, resultando na imobilização das partículas. Os grânulos foram ressuspensos em 25 mL de tampão TE 1X e armazenados à temperatura ambiente para uso.

### 4.4.2 Tampão GITC

Para a preparação do tampão, de forma resumida, em um recipiente foram adicionados GITC, solução de TRIS-HCL, EDTA e antiespumante. Posteriormente, 25 mL de água ultrapura foram adicionados, aguardando a total solubilização da GITC com auxílio de aquecimento e homogeneização. O pH da solução foi ajustado entre 7,6 e 8,0 utilizando solução de NaOH. O volume foi completado para 50 mL com água ultra pura. O conteúdo foi filtrado e posteriormente, armazenado a temperatura ambiente para uso. Os reagentes necessários para a constituição do tampão GITC (OBERACKER et al., 2019; POSSEBON et al., 2022) estão descritos na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados para produção do tampão GITC

Reagente	Concentração	Para 50 mL*
<b>GITC</b>	5.5 M	32,5 g
<b>Tris HCl pH 7.6–8.0</b>	50 mM	2,5 mL (de solução estoque à 1 M)
<b>Sarkosyl</b>	2%	1 g
<b>EDTA</b>	20 mM	2 mL (de solução estoque à 0,5 M)
<b>Antiespumante</b>	0.1 %	50 µL
<b>Água ultra pura</b>		25 mL

\*Quantidade em gramas de reagente para produção de 50 mL de solução.

#### 4.4.3 Tampão eluição

Os ácidos nucleicos isolados foram ressuspensos em uma solução constituída por 5 mM Tris-HCl, pH 8.5 (OBERACKER et al., 2019), utilizando água esterilizada e tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich). A solução foi armazenada refrigerada a 4 °C a fim de diminuir o risco de contaminação.

**Tabela 2.** Reagentes utilizados para produção do tampão eluição

Reagente	Concentração	Para 50 mL*
Tris HCl pH 8.0	1 M	250 µL
Água ultra pura DEPC		49,750 mL

### 4.5 Delineamento experimental

#### 4.5.1 Piloto

Os procedimentos experimentais iniciais foram realizados com o objetivo de avaliar o volume de soluções e partículas magnéticas adequado para o protocolo proposto. A princípio, foram realizadas extrações seguindo o protocolo referência publicado por Possebon et al. (2022). O protocolo foi aplicado para o PCV inicialmente em amostras de sangue. O tampão de eluição do protocolo referência foi substituído a fim de preservar o ácido nucleico de interesse deste estudo, sendo utilizado tampão descrito por Oberacker et al. (2019) para eluição de DNA. Foram realizadas modificações no protocolo para melhorar a eficiência. Concomitantemente, as mesmas amostras foram submetidas às extrações utilizando o kit baseado em coluna de sílica EasyPure<sup>®</sup>Blood Genomic DNA KIT (Transgen Biotech), seguindo as recomendações do fabricante, o qual é normalmente utilizado no Serviço de Diagnóstico do PCV pelo IBTEC (Unesp). Este kit foi utilizado como controle positivo de extração para fins de comparação da determinação da concentração de DNA do PCV pela qPCR, para o novo método. Por fim, o protocolo desenvolvido nesse estudo em amostras de sangue total foi aplicado para extração de DNA em amostras de soro e saliva.

#### 4.5.2 Protocolo de extração de DNA do PCV utilizando partículas magnéticas carboxiladas em amostras de sangue total (POSSEBON et al., 2022)

Em um tubo de 1,5 mL foram combinados 100 µL de tampão GITC, 270 µL de isopropanol, 20 µL de suspensão de partículas magnéticas e 10 µL de proteinase K [20mg/mL]. Foram adicionados 200 µL de amostra, seguido por homogeneização com

auxílio de uma pipeta. O tubo foi colocado na estante magnética para separação por 30 segundos, tendo o sobrenadante removido em seguida com cuidado para não perturbar o as partículas. O tubo foi removido da estante e adicionado 150  $\mu\text{L}$  de isopropanol, seguido por homogeneização com a pipeta para efetuar a primeira lavagem. Em seguida, o mesmo foi colocado na estante magnética por 30 segundos, com posterior remoção do sobrenadante. O tubo foi retirado da estante magnética e 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados para totalizar duas lavagens. O volume foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta e em seguida, o tubo foi colocado na estante magnética por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e o tubo foi incubado aberto ainda magnetizado por 5 minutos, para evaporação do etanol residual. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do tampão de eluição de DNA, o conteúdo foi homogeneizado e o tubo colocado na estante magnética com incubação por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado para um novo tubo e o mesmo armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os DNAs extraídos foram submetidos à qPCR para quantificação do DNA do PCV.

#### **4.5.3 Modificações do protocolo Possebon et al. (2022)**

Foram realizadas adaptações no volume de amostra e das soluções utilizadas. Com o objetivo de desenvolver um protocolo único para os três tipos de amostras propostos, foi determinado a utilização de 100 $\mu\text{L}$  de amostra nos procedimentos experimentais subsequentes. Os volumes das soluções tampão GITC, isopropanol e etanol 70% foram aumentados para melhorar a eficiência do protocolo. O volume da suspensão de partículas magnéticas foi modificado a fim de melhorar a recuperação do ácido nucleico. Modificações na execução do protocolo também foram realizadas.

Sendo assim, em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 350  $\mu\text{L}$  de tampão GITC, 350  $\mu\text{L}$  de isopropanol, 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K e 100  $\mu\text{L}$  de amostra (sangue total). O conteúdo foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta. Posteriormente, 40  $\mu\text{L}$  da suspensão de partículas magnéticas foi adicionado ao tubo, seguido por homogeneização com a pipeta. O conteúdo foi incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. O tubo foi colocado na estante magnética para separação por 1 minuto, tendo o sobrenadante removido em seguida com cuidado para não perturbar as partículas. Com o tubo ainda na estante magnética, foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 250  $\mu\text{L}$  de tampão GITC, seguido pela remoção do tubo da estante com homogeneização utilizando a pipeta para efetuar a primeira lavagem. Em seguida, o mesmo foi colocado na estante magnética

por 30 segundos, com posterior remoção do sobrenadante. Foram adicionados 500 µL de etanol 70% ao tubo para realização da segunda lavagem, com o mesmo ainda na estante magnética. O tubo foi retirado da estante sendo realizado a homogeneização do volume com auxílio de uma pipeta e em seguida, o tubo foi colocado na estante magnética por 30 segundos. O sobrenadante foi removido e o tubo foi incubado aberto ainda magnetizado por 1 minuto, para evaporação do etanol residual. Foi retirado o excesso de solução presente no tubo com o auxílio de uma pipeta com cuidado para não perturbar as partículas. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do tampão de eluição de DNA ao tubo ainda na estante magnética, em seguida retirado da estante e realizada a homogeneização do volume com a pipeta. O tubo foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o tubo foi colocado na estante magnética com incubação por 1 minuto, o sobrenadante foi coletado para um novo tubo e armazenado a -20°C. Os extraídos foram submetidos a qPCR para análise de quantificação do DNA do PCV.

#### **4.5.4 Avaliação do volume de partículas magnéticas adequado para extração de DNA do PCV**

Foram realizados testes para a determinação do volume adequado de partículas magnéticas para a utilização no protocolo modificado, em amostras de sangue total. Todos os outros parâmetros foram mantidos a fim de avaliar isoladamente a interferência das partículas magnéticas na eficiência do protocolo. Foram testados os volumes de 40 µL, 60 µL, 80 µL e 90 µL da suspensão de partículas na mesma concentração.

#### **4.5.5 Avaliação do protocolo proposto em amostras de soro e saliva para extração de DNA do PCV**

A partir do desenvolvimento do protocolo adequado para extração de DNA do PCV em amostras de sangue total, o mesmo protocolo foi utilizado para a extração de DNA a partir de amostras de soro e saliva para avaliação da eficácia do protocolo em diferentes amostras.

### **4.6 Padronização do protocolo proposto para extração de DNA do PCV**

A partir do resultado do piloto, com a obtenção do protocolo adequado para a extração do PCV em amostras de saliva, sangue total e soro, foi realizada a padronização da metodologia desenvolvida. Para isso foram realizadas 282 extrações, divididas em nove grupos contendo 30 amostras (25 positivas e 5 negativas), separados de acordo com

o fluido e a metodologia empregada. Para cada grupo, dois controles negativos constituídos de água *nuclease-free* foram adicionados para validação da extração. No Quadro 1 apresentam-se os grupos amostrais. As extrações utilizando os kits comerciais EasyPure<sup>®</sup>Blood Genomic DNA KIT (TransGen Biotech CO., LTD) (identificado como Coluna) e MagMAX<sup>™</sup> CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo-Fisher Scientific) (identificado como MM) foram realizadas seguindo as orientações de cada fabricante e posteriormente testadas para a detecção do DNA do PCV por qPCR. O método caseiro de extração proposto neste trabalho foi identificado como Bead.

**Quadro 1.** Grupos amostrais

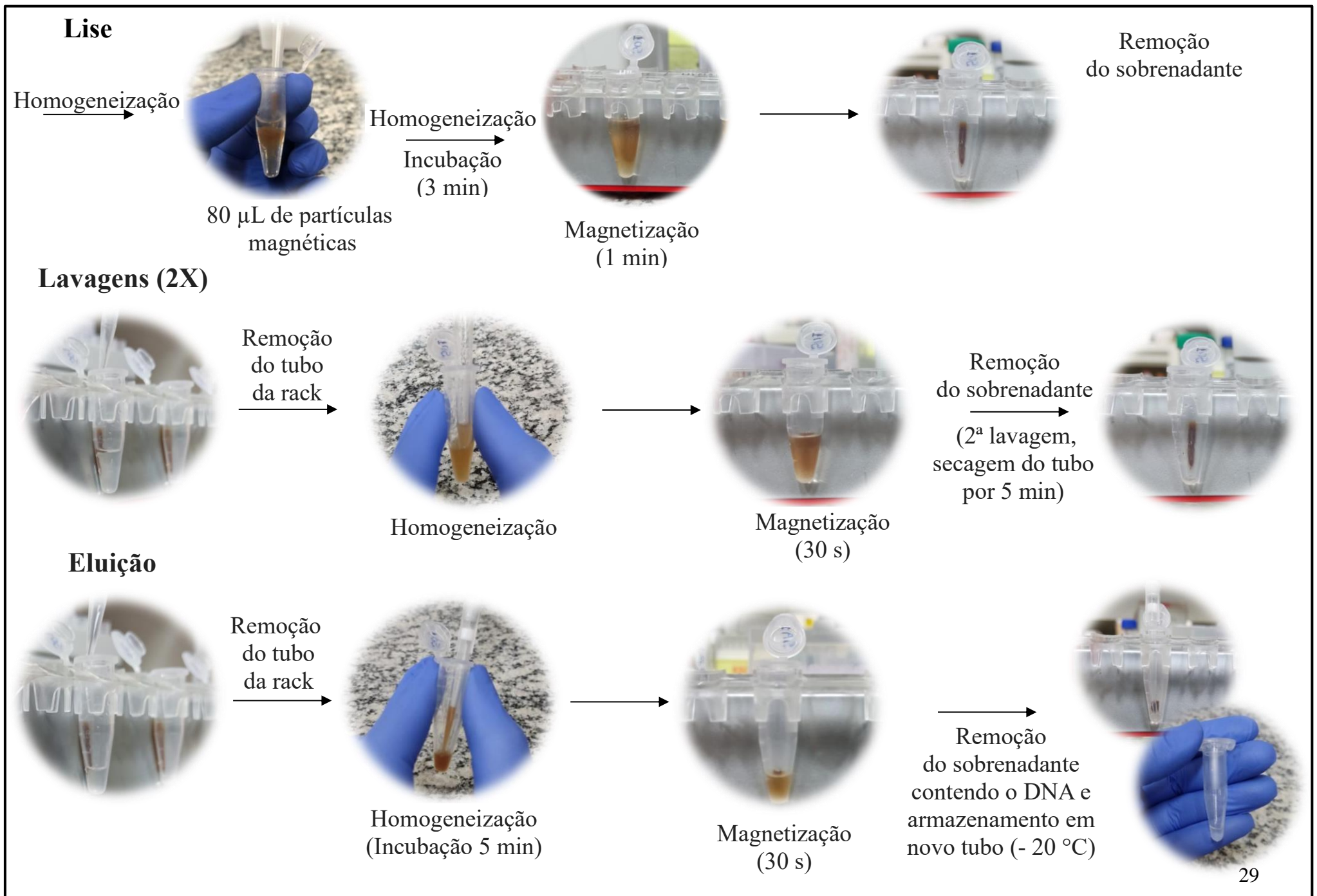
Grupo	Amostra	Metodologia de extração	Controle negativo da extração
1	Saliva	Bead	2
2	Saliva	Coluna	2
3	Saliva	MM	2
4	Soro	Bead	2
5	Soro	Coluna	2
6	Soro	MM	2
7	Sangue	Bead	2
8	Sangue	Coluna	2
9	Sangue	MM	2

Coluna: extrações realizadas pelo kit comercial EasyPure<sup>®</sup>Blood Genomic DNA KIT, MM: extrações realizadas pelo kit comercial MagMAX<sup>™</sup> CORE Nucleic Acid Purification Kit e Bead: extrações realizadas pelo protocolo caseiro.

#### **4.6.1 Extração de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido**

Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 710 µL de tampão de lise (350 µL de solução GITC, 350 µL isopropanol e 10 µL de proteinase K). Posteriormente, foram adicionados 100 µL de cada amostra. O conteúdo foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta, posteriormente adicionados 80 µL da suspensão de partículas magnéticas carboxiladas, seguido de homogeneização. O conteúdo foi incubado por um minuto a temperatura ambiente e posteriormente o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta, utilizando a estante para separação. Em seguida foram adicionados 250 µL da solução GITC e 250 µL de isopropanol para realização da primeira lavagem das partículas. Para a segunda lavagem, 500 µL de etanol 70% foram utilizados, sendo

totalmente retirado o excesso com o auxílio de uma pipeta. O tubo foi incubado aberto por três minutos a temperatura ambiente para remoção do etanol residual por evaporação. 100 µL do tampão de eluição foram adicionados para eluição do DNA. O conteúdo foi homogeneizado e incubado por cinco minutos a temperatura ambiente, em seguida, o tubo foi colocado na estante magnética para imobilização das partículas. O sobrenadante foi coletado para um novo tubo e armazenado a - 20 °C para futuras aplicações. O diagrama do processo de extração e purificação de DNA pelo protocolo desenvolvido neste trabalho está mostrado na figura 1.



**Figura 1.** Diagrama de execução manual do protocolo de extração desenvolvido.

#### **4.6.2 Extração de DNA do PCV utilizando kit EasyPure® Blood Genomic DNA KIT**

Para execução deste protocolo, foram adicionados 100 µL de amostra em um tubo de 1,5 mL, 20 µL de Proteinase K e 500 µL de tampão BB3. O conteúdo foi homogeneizado com auxílio de um homogeneizador automático (vórtex) por 15 segundos e, em seguida, incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. O tubo foi centrifugado brevemente (*spin*) e o lisado transferido para uma coluna de centrifugação. A coluna foi inserida dentro de um novo tubo, e os mesmos foram centrifugados a 12.000×g por 1 minuto, posteriormente, a coluna foi retirada e o volume coletado no tubo descartado. Para a primeira lavagem, foram adicionados à coluna 500 µL de tampão CB3, previamente preparado com adição de etanol, seguindo as instruções do fabricante. O tubo com a coluna foi centrifugado a 12.000×g por 30 segundos, e o volume coletado no tubo, descartado. 500 µL de tampão WB3, previamente preparado com adição de etanol de acordo com as instruções do fabricante, foram adicionados à coluna. O tubo com a coluna foi centrifugado a 12.000×g por 30 segundos, após, descartado o volume coletado no tubo. Este processo foi repetido, para o total de 3 etapas de lavagem. O tubo contendo a coluna vazia foi centrifugado para remoção do excesso de solução WB3, a 12.000×g por dois minutos. Posteriormente, a coluna foi incubada a temperatura ambiente por alguns minutos para a secagem. A coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL estéril para o processo de eluição. Desta maneira, o volume de 100 µL de tampão de eluição previamente aquecido à 60°C foi adicionado no centro da coluna. O conteúdo foi incubado a temperatura ambiente por um minuto. O novo tubo contendo a coluna foi centrifugado a 12.000×g por 1 minuto para eluir o DNA. A coluna foi descartada e o tubo armazenado -20°C.

#### **4.6.3 Extração de DNA do PCV utilizando kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit**

Para esse protocolo, em um tubo de 1,5 foram adicionados 10 µL da solução de proteinase K e 20 µL da suspensão de partículas magnéticas do kit. O volume foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de amostra, realizando nova homogeneização com a pipeta, de 5 a 6 vezes o conteúdo. O volume de 700 µL da solução de lise foi adicionado à mistura contendo proteinase K, partículas e amostra. O conteúdo foi homogeneizado com a pipeta e em seguida, incubado



à temperatura ambiente por 1 minuto. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta, utilizando uma estante magnética para imobilização e separação das partículas. Foram adicionados 500 µL da solução de lavagem 1, ao conteúdo seguido por homogeneização. O tubo foi magnetizado e o sobrenadante removido. O processo de lavagem foi realizado novamente, utilizando a solução de lavagem 2. Após a retirada do sobrenadante da segunda lavagem, o tubo foi ser incubado aberto à temperatura ambiente por três minutos para evaporação da solução de lavagem 2 residual. O volume de 100 µL do tampão de eluição do kit foram adicionados para eluição do DNA. O conteúdo foi homogeneizado com pipeta e incubado por cinco minutos a temperatura ambiente. Por fim, o tubo foi magnetizado utilizando a estante magnética e o eluato foi coletado para um novo tubo e armazenado a - 20 °C.

#### **4.7 Otimização do protocolo desenvolvido para extração de DNA do PCV**

Após a padronização do protocolo para os três tipos de amostras, foram realizadas modificações a fim de otimizar os resultados em relação a concentração de DNA e pureza dos produtos. Para isso, o protocolo desenvolvido foi executado de forma automatizada utilizando o equipamento de extração automático KingFisher Flex System (ThermoFisher, EUA), disponível no laboratório. Modificações nas etapas de lavagens também foram realizadas a fim de avaliar o número de processos e solução ideal a ser utilizada em cada etapa.

##### **4.7.1 Extração automatizada de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido**

Todas as soluções utilizadas no protocolo automático (lise, lavagem 1, lavagem 2 e eluição) foram preparadas previamente em tubos de 50 mL estéreis, seguindo os mesmos parâmetros de volume e concentração do tópico “4.6.1 Extração de DNA do PCV utilizando protocolo desenvolvido”, e posteriormente distribuídas em suas respectivas placas. Foram realizadas extrações utilizando 30 amostras de saliva, sangue total e soro, anteriormente utilizadas na padronização do protocolo, totalizando 90 amostras. Para validação da extração foi adicionado um controle negativo constituído de água *nuclease-free* à placa.

#### 4.7.2 Avaliação dos parâmetros de lavagem

A partir dos resultados satisfatórios com a execução automática do protocolo desenvolvido, foram realizadas modificações nas etapas de lavagem a fim de melhorar os parâmetros de pureza anteriormente observados. Foram avaliadas nove adaptações do protocolo padrão “*in house*” (Protocolo 1) sobre os três tipos de amostras. Para isso, foram utilizadas 12 amostras de cada um dos fluídos (saliva, sangue total e soro) extraídas de forma automatizada.

**Quadro 2.** Adaptações avaliadas do protocolo desenvolvido (*in house*)

Protocolo	Lavagem 1 (500µl)	Lavagem 2 (500µl)	Lavagem 3 (500µl)
Protocolo 1 (padrão)	GITC+Isopropanol	Etanol 70%	-
Protocolo 2	Isopropanol	Etanol 70%	-
Protocolo 3	GITC+Isopropanol	Isopropanol	-
Protocolo 4	GITC+Isopropanol	Etanol 80%	-
Protocolo 5	GITC+Isopropanol	Etanol 70%	Etanol 70%
Protocolo 6	GITC+Isopropanol	Isopropanol	Etanol 70%
Protocolo 7	GITC+Isopropanol	Etanol 80%	Etanol 70%
Protocolo 8	GITC+Isopropanol	Etanol 70%	Etanol 80%
Protocolo 9	GITC+Isopropanol	Isopropanol	Etanol 80%
Protocolo 10	GITC+Isopropanol	Etanol 80%	Etanol 80%

#### 4.8 Curva de eficiência

Com o resultado da etapa de otimização, obtendo a melhor adaptação do protocolo, a eficiência do método de extração foi determinada através da construção de uma curva padrão para cada tipo de amostra. Para isso, uma amostra de saliva, sangue total e soro, previamente caracterizadas positivas e quantificadas para PCV por qPCR, foram utilizadas. Foi realizada a diluição de forma seriada das amostras positivas utilizando uma amostra negativa da mesma matriz, partindo do ponto mais concentrado (amostra positiva pura) até o ponto  $10^{-6}$ . As amostras de saliva e sangue total foram diluídas na razão 1:10. Para a amostra de soro a razão de diluição aplicada foi de 1:5.

Todas as amostras foram extraídas em triplicata e de forma automática utilizando o equipamento KingFisher Flex System.

## **5. ANÁLISES**

### **5.1 Detecção e quantificação do PCV por qPCR**

As amostras de DNA obtidas a partir dos procedimentos experimentais realizados foram analisadas através da técnica de qPCR, utilizando o kit de reação GoTaq® qPCR Master Mix SYBR® Green, 2X (Promega), seguindo o protocolo de preparo da reação e as condições de termociclagem descritos por Cruz et al. (2014). Foi utilizado um conjunto de primers para detecção do circovírus suíno (PCV - *Porcine circovirus*), com as sequências descritas por Ladekjaer- Mikkelsen et al. (2002). Foi utilizado o equipamento AriaMx Real-Time PCR (qPCR) Instrument (Agilent), com análise pelo software Agilent Aria Mx (2014-2019). A construção da curva padrão para realização da quantificação absoluta e a obtenção da concentração de DNA do PCV foram executados conforme descrito por Cruz et al. (2014). Os resultados foram expressos como o log do número de cópias de DNA do PCV/ $\mu\text{L}$  de amostra.

### **5.2 Análise de pureza e quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotometria UV-vis**

Os extraídos foram submetidos à análise de pureza e quantificação de ácidos nucleicos utilizando o equipamento NanoDrop (NanoDrop® ND – 1000 UV-Vis (Thermo Fisher). As leituras foram realizadas em duplicata utilizando 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra e como branco, 1  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções de eluição de acordo com o kit utilizado. Os resultados foram analisados utilizando o software NanoDrop versão 3.8.1 (Thermo Fisher) seguido de análise estatística para avaliação e correlação entre os métodos de extração.

### **5.3 Forma de análises dos resultados**

O parâmetro de sensibilidade dos protocolos foi analisado através da comparação da concentração de DNA do PCV (log do número de cópias DNA/ $\mu\text{L}$ ) entre os protocolos, quantificados pela qPCR. Foram aplicados os testes para análise de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (Gráfico Quantil-Quantil e histograma). O coeficiente de Spearman foi utilizado para verificar se houve correlação entre as concentrações de DNA do PCV para os métodos de extração analisados. Para verificar se houve diferenças

entre a mediana da concentração de DNA do PCV entre cada método de extração, os testes de Friedman seguido por Dunns e teste de Wilcoxon foram utilizados. Foi considerado somente amostras onde houve quantificação concomitante pelos três métodos. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação entre os valores de Cq obtidos dos protocolos na etapa de otimização. Para todos os métodos estatísticos o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

O parâmetro de qualidade dos materiais extraídos foi verificado através da distribuição das razões 260/280 e 260/230 com testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e análises gráficas (gráfico Quantil-Quantil e histograma). Os testes de Friedman seguido por Dunns e Wilcoxon foram utilizados para verificar se existiam diferenças nas medianas dos valores para cada protocolo de extração, dentro de cada grupo de amostra. Foram consideradas diferenças estatísticas significativas quando  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0.1.

## **6. RESULTADO**

### **6.1 Análise do piloto**

Duas amostras de sangue total identificadas como amostras A e B foram testadas. Ambas as amostras extraídas pelo kit (controle positivo) apresentaram ampliações para PCV com Tm (“melting temperature”) de 82°C. Os valores de Cq (ciclo de quantificação) dessas amostras foram 32,95 e 34,7, respectivamente. Apenas a amostra A, extraída com o protocolo referência Possebon et al. (2022), apresentou amplificação com valor de Cq 29,87 e Tm de 81,50°C. Não foi observado amplificação para a amostra B para PCV.

Novas extrações foram realizadas a partir de outras duas amostras de sangue total (amostras E e F). Foram realizadas modificações nos volumes de: tampão GITC (350 µL), isopropanol (350 µL), etanol (500 µL) e no volume da suspensão de partículas magnéticas (40 µL). Foram observadas ampliações em ambas as amostras testadas com o protocolo modificado, com valores de Cq de 33,09 para amostra E e 33,37 para amostra F. Os valores de Tm das amostras foram de 82,5°C e 82°C, respectivamente. Os controles positivos apresentaram ampliações para PCV (Tm 82 °C), com valores de Cq de 29,33 para amostra E kit e 29,36 para amostra F kit. Foi observado melhora na recuperação do DNA do PCV com o aumento dos volumes das soluções.

Foram realizadas variações do volume da suspensão de partículas magnéticas a fim de otimizar o protocolo proposto. Para isso, foram utilizadas novas amostras de sangue, G e H. As extrações foram realizadas utilizando os volumes de 20 µL, 30 µL, 40 µL, 60 µL, 80 µL e 90 µL. Todas as amostras apresentaram amplificação para PCV, exceto a amostra G extraída com 90 µL de partículas magnéticas. Foi observado que para as amostras de sangue total analisadas, o volume de partículas com melhor recuperação de DNA do PCV utilizado no protocolo modificado foi de 80 µL.

**Quadro 3.** Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de sangue

Amostra/vol.	Volume de partículas (µL)	Tm	Cq
G 20	20	81°C	36,84
G 30	30	81,5°C	35,12
G 40	40	81,5°C	34,35
G 60	60	82,1°C	33,00
<b>G 80</b>	<b>80</b>	<b>81°C</b>	<b>32,64</b>
G 90	90	67°C	No Cq
G kit	Coluna	81°C	32,82
H 20	20	81°C	32,68
H 30	30	81,5°C	31,33
H 40	40	81,5°C	30,49
H 60	60	81,9°C	30,96
<b>H 80</b>	<b>80</b>	<b>81°C</b>	<b>29,76</b>
H 90	90	79°C	33,21
H kit	Coluna	81,5°C	29,73

O protocolo foi avaliado para as amostras de soro. Foram utilizadas duas amostras de soro (amostras J e K). Ambas foram extraídas utilizando 60µL e 80µL da suspensão de partículas, os quais foram associados aos melhores rendimentos de DNA do PCV nos testes realizados com amostras de sangue. Todas as amostras apresentaram amplificação para PCV com Tm de 82°C. Foi observado que para as duas amostras de soro analisadas, os valores de 60µL e 80µL da suspensão de partículas magnéticas apresentaram valores de Cq semelhantes.

**Quadro 4.** Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de soro

Amostra (soro)	Volume de partículas (µL)	Tm	Cq
J 60	60	82°C	25,58
<b>J 80</b>	<b>80</b>	82°C	<b>25,17</b>
J kit	Coluna	82°C	24,45.
K 60	60	82°C	24,76
<b>K 80</b>	<b>80</b>	82°C	<b>23,97</b>
K kit	Coluna	82°C	24,05

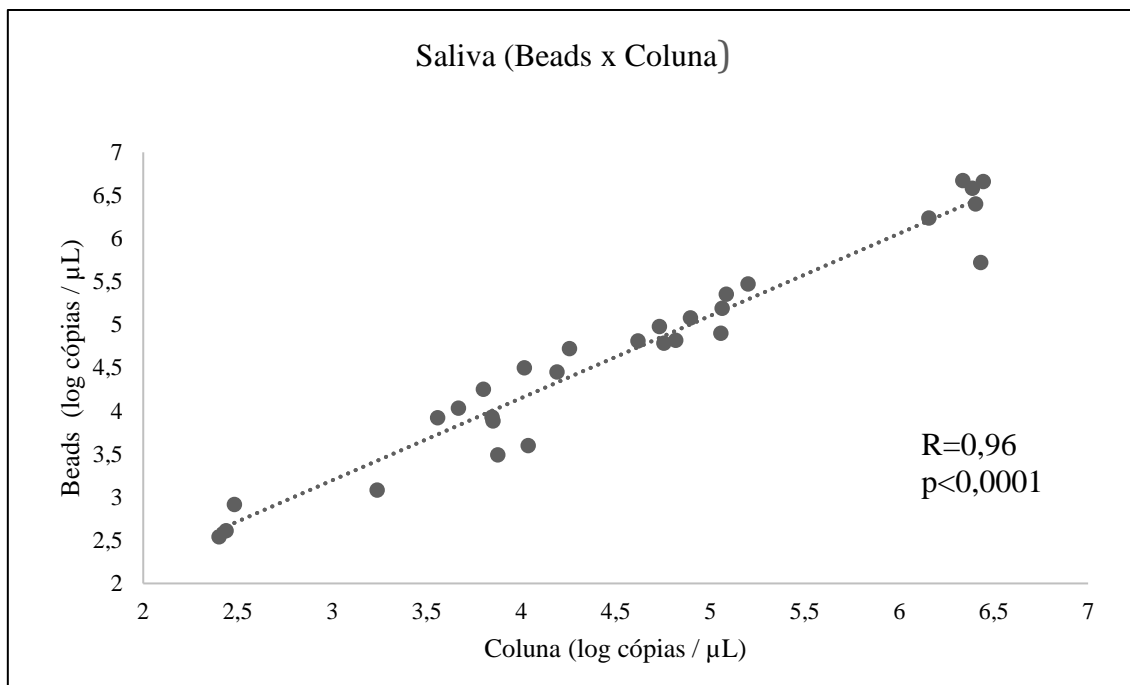
O protocolo desenvolvido foi submetido a extração de amostras de salivas. Com o volume ótimo de partículas observado nos testes anteriores de 80µL, foram realizadas as extrações de quatro amostras de saliva (amostras L, M, N e O) a fim de avaliar a reprodutibilidade dos resultados anteriormente encontrados. Todas as amostras apresentaram amplificação para PCV com Tm variando entre 82°C a 82,5°C.

**Quadro 5.** Valores de Cqs obtidos através da qPCR no teste de avaliação do volume de partículas magnéticas em amostras de saliva

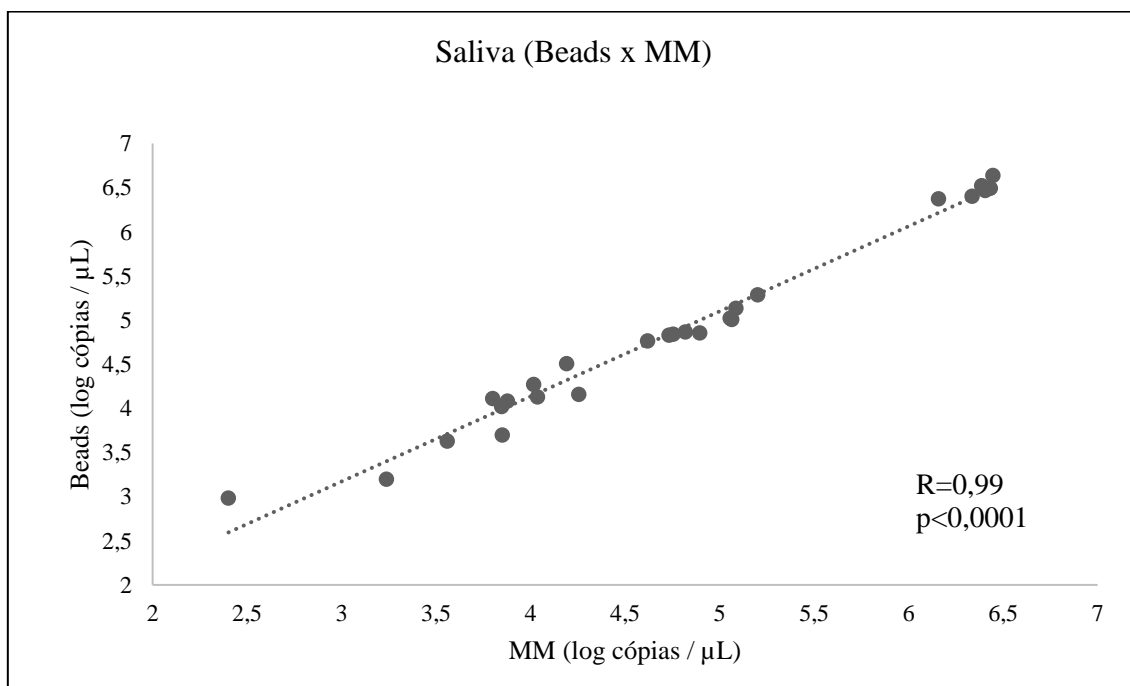
Amostra (saliva)	Volume de partículas (µL)	Tm	Cq
<b>L 80</b>	<b>80</b>	<b>81,5°C</b>	<b>30,54</b>
L kit	Coluna	82°C	32,77
<b>M 80</b>	<b>80</b>	<b>82°C</b>	<b>26,76</b>
M kit	Coluna	82,5°C	26,62
<b>N 80</b>	<b>80</b>	<b>81,5°C</b>	<b>30,42</b>
N kit	Coluna	82°C	30,55
<b>O 80</b>	<b>80</b>	<b>82°C</b>	<b>26,41</b>
O Kit	Coluna	82°C	27,27

## 6.2 Análise da padronização

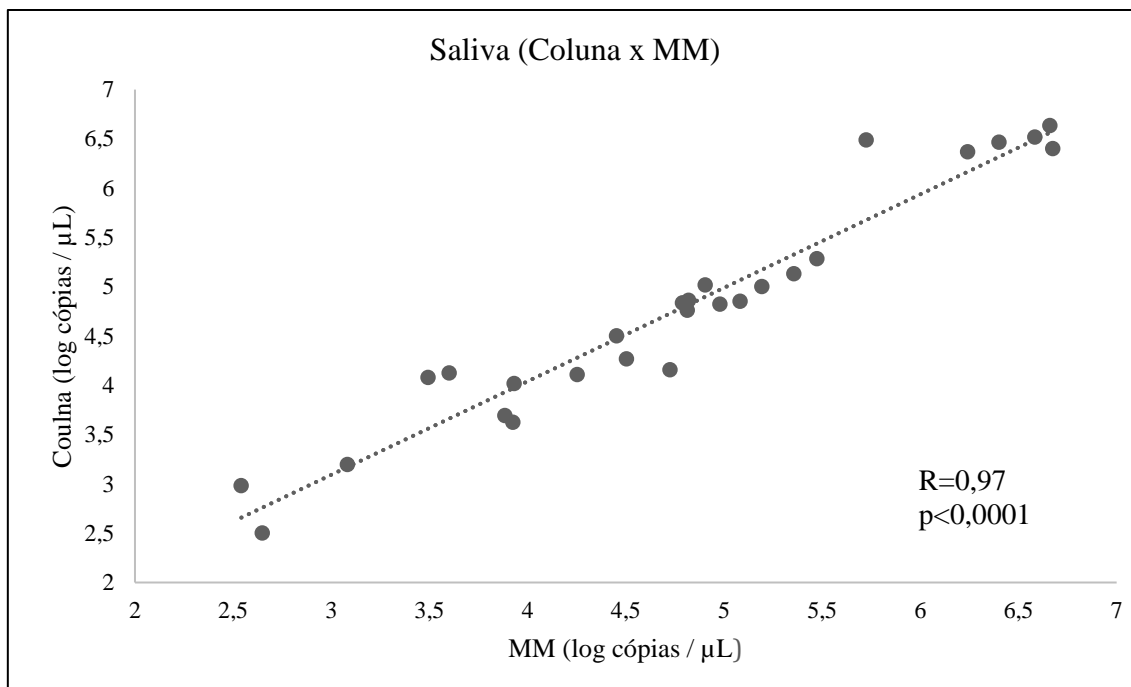
Os dados de curva padrão obtidos nas reações de qPCR foram: eficiência de 82,55%, coeficiente de correlação (r) igual a 0,984, slope -3,826 com a formação de um pico único com a Tm de 82 °C.



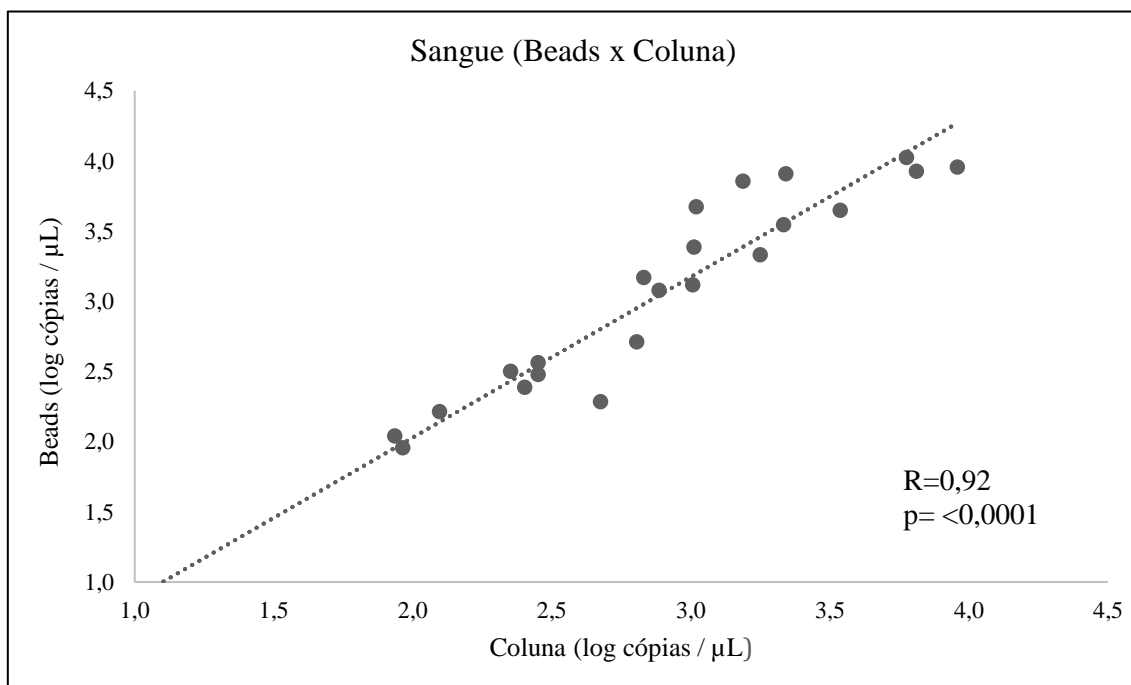
**Figura 2.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtidos por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de coluna (Coluna). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p<0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos



**Figura 3.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p<0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos

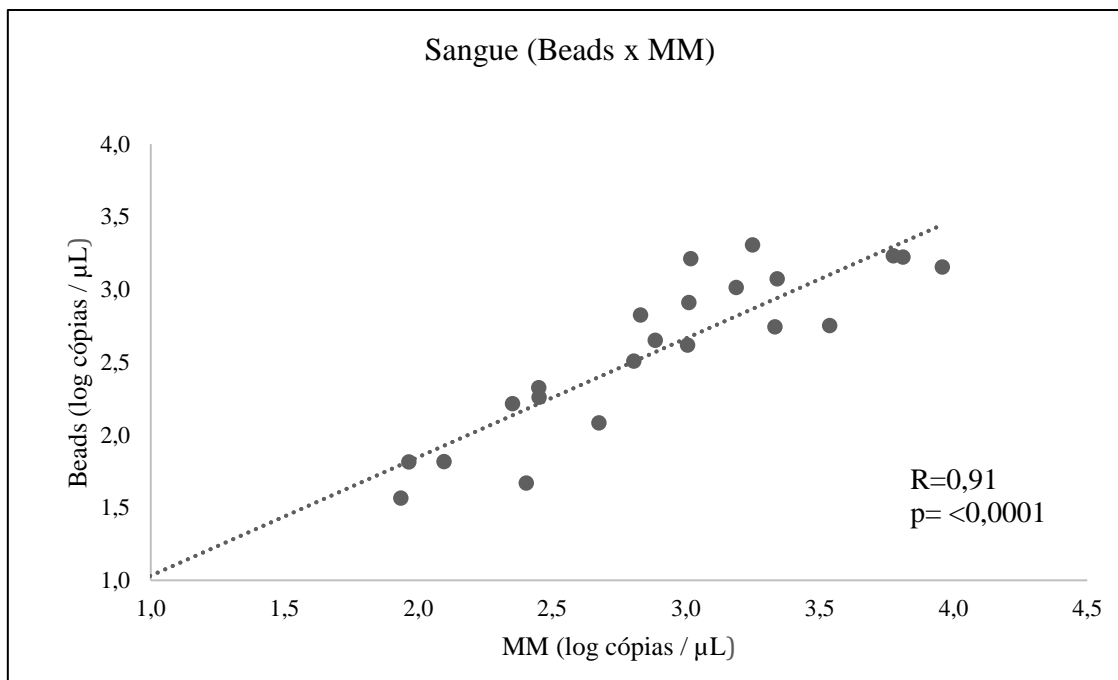


**Figura 4.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de saliva submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p<0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos

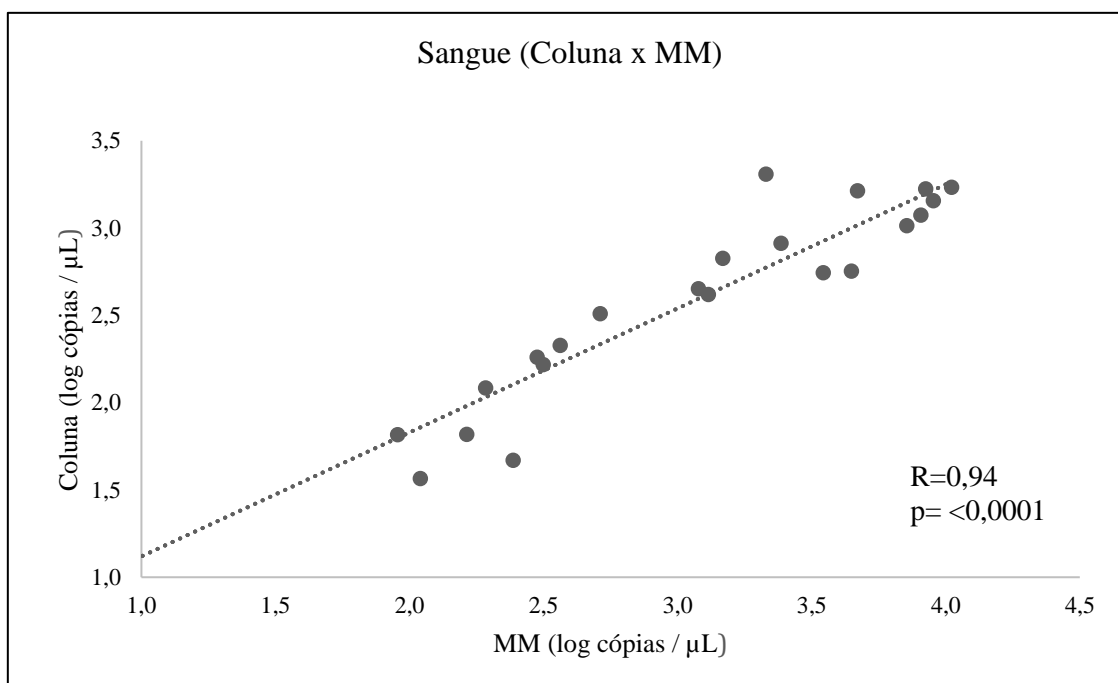


**Figura 5.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue total submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de coluna (Coluna). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p<0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos

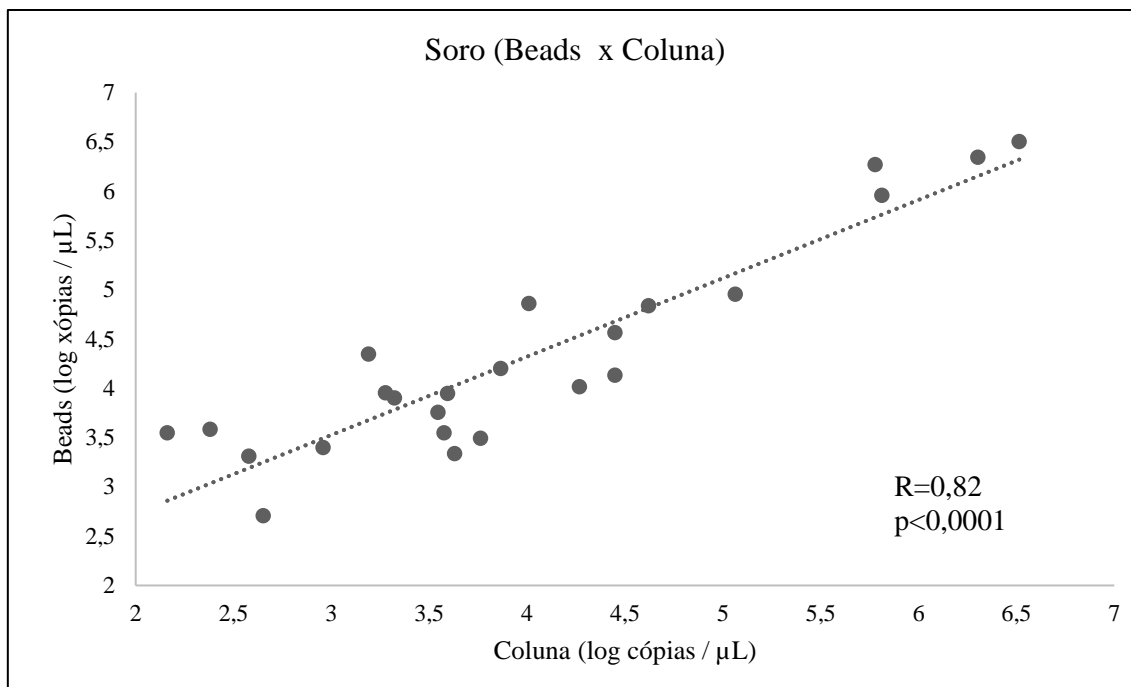




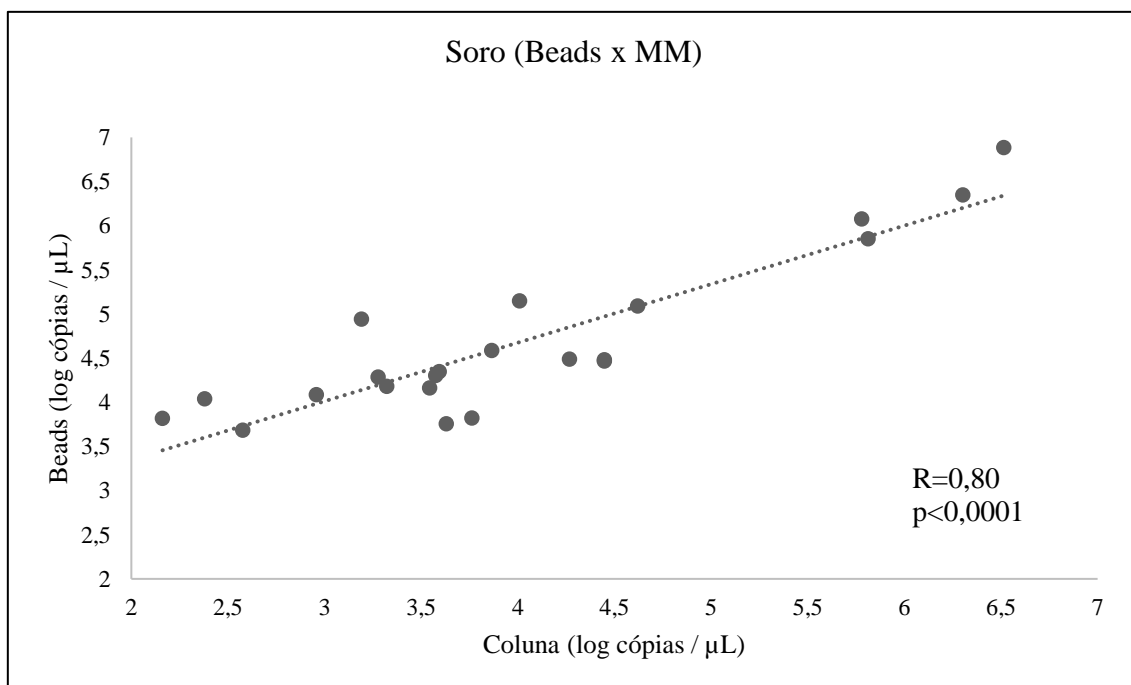
**Figura 6.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue total submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p<0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos



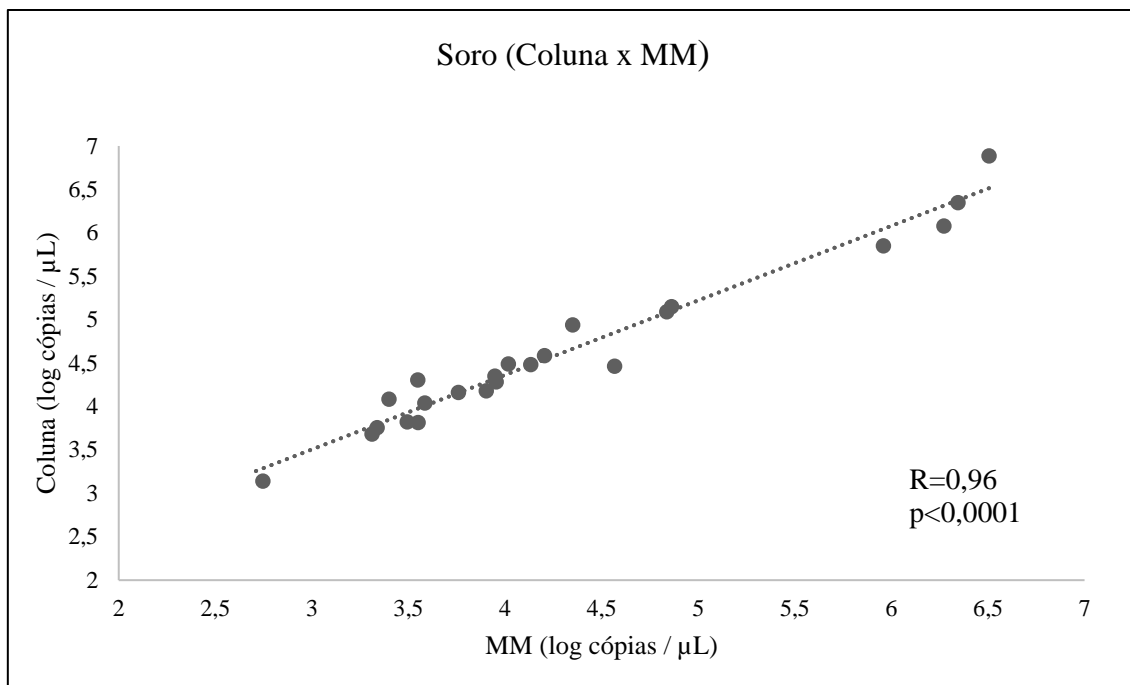
**Figura 7.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de sangue submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p<0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos



**Figura 8.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos

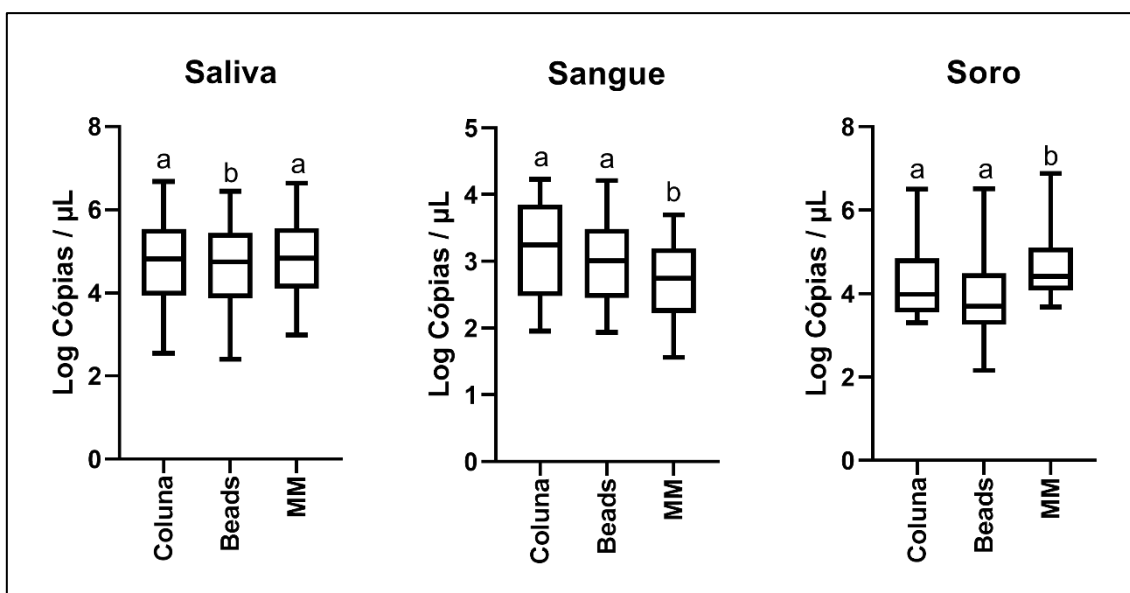


**Figura 9.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações por protocolo desenvolvido (Beads) e kit comercial de partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos



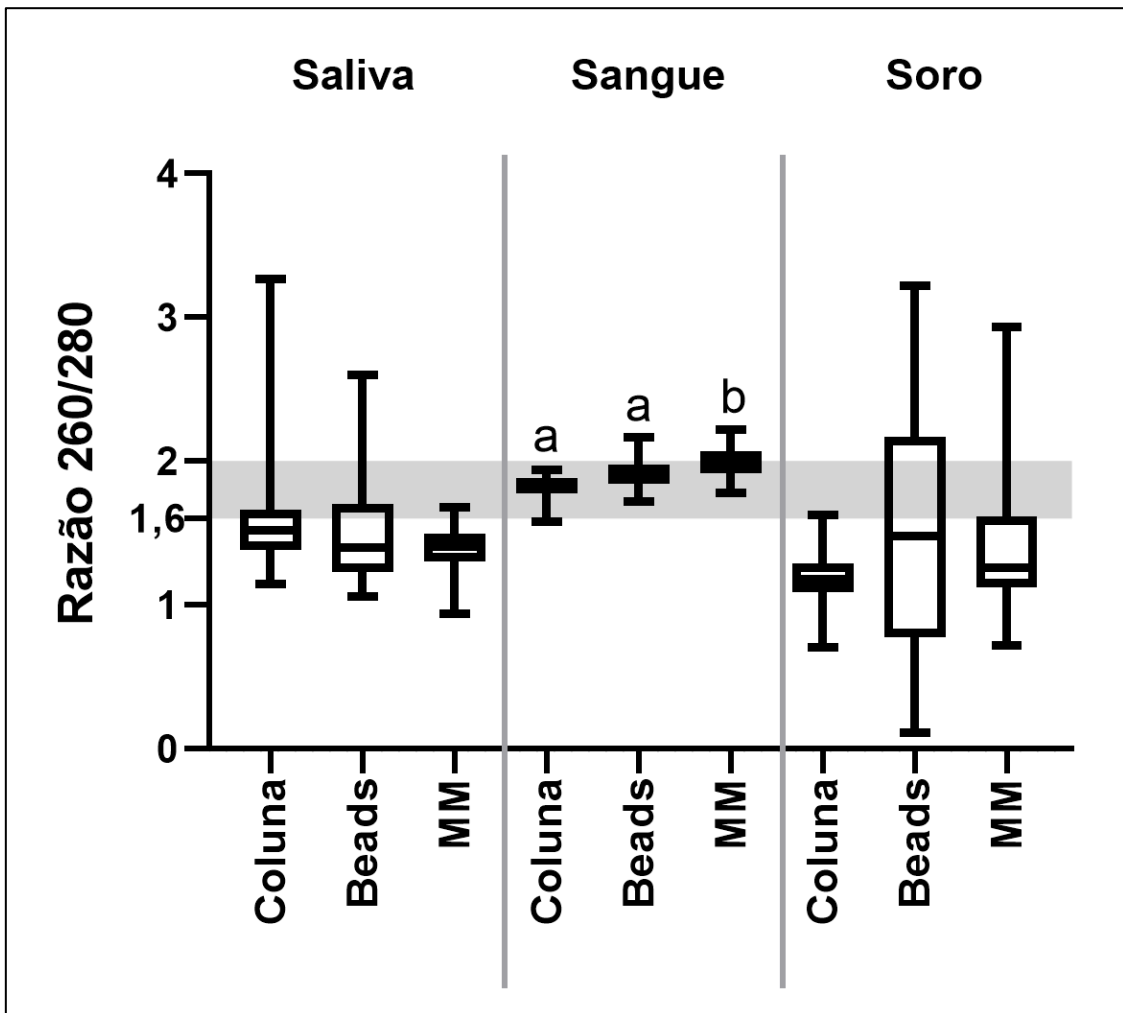
**Figura 10.** Gráfico de dispersão da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR para PCV em amostras de soro submetidas às extrações pelos kits comerciais de coluna de sílica (Coluna) e partículas magnéticas (MM). R= Coeficiente de Spearman, valores  $p < 0,05$  indicam coeficientes de correlação estatisticamente significativos

A comparação das concentrações de DNA de PCV quantificadas pela qPCR obtidos para cada tipo de amostra e para os diferentes métodos de extração estão apresentados na **Figura 11**.

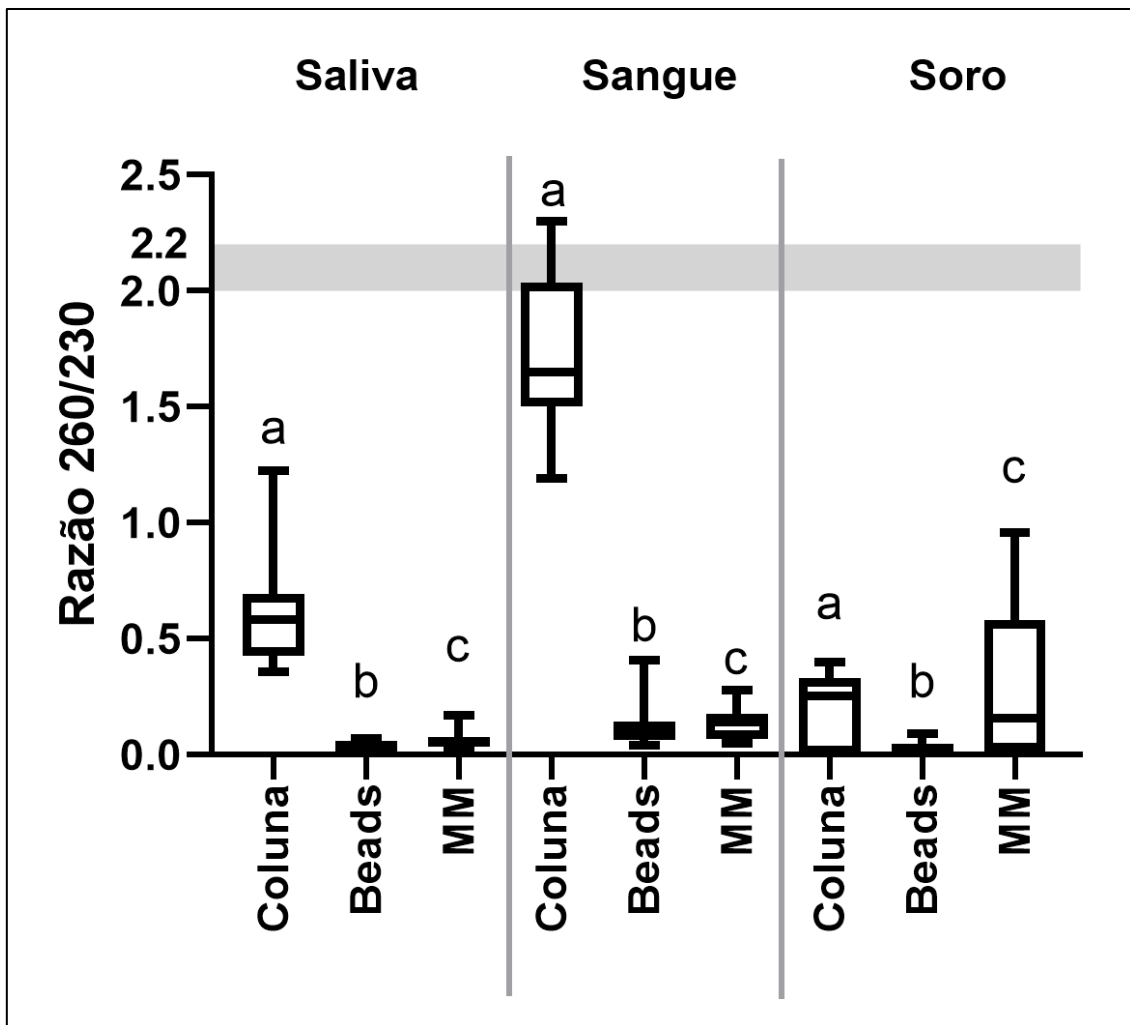


**Figura 11.** Gráfico de distribuição da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR de amostras de PCV por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns

Os resultados da análise de pureza (razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis) estão representados na **Figura 12 e 13**, respectivamente.



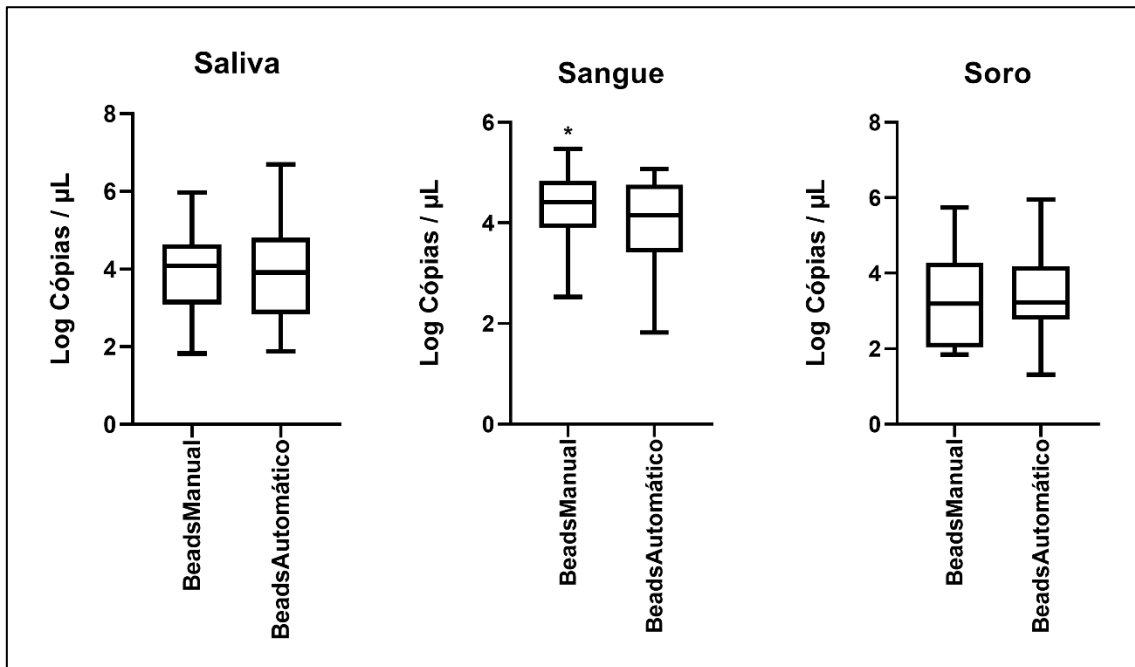
**Figura 12.** Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns



**Figura 13.** Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e método de extração. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Friedman seguido por Dunns

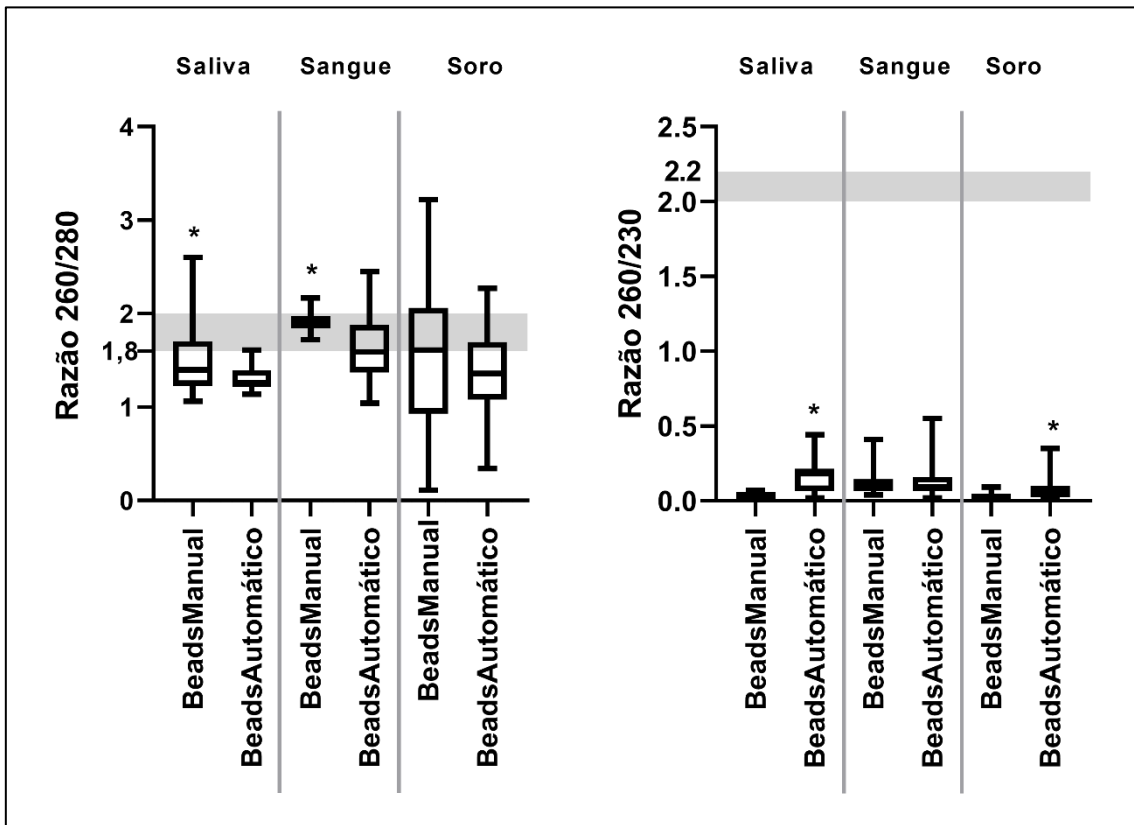
### 6.3 Análise da otimização

A comparação das concentrações de DNA de PCV quantificadas pela qPCR obtidos para cada tipo de amostra e para os protocolos de extração *in house* manual e automático estão apresentados na **Figura 14**.



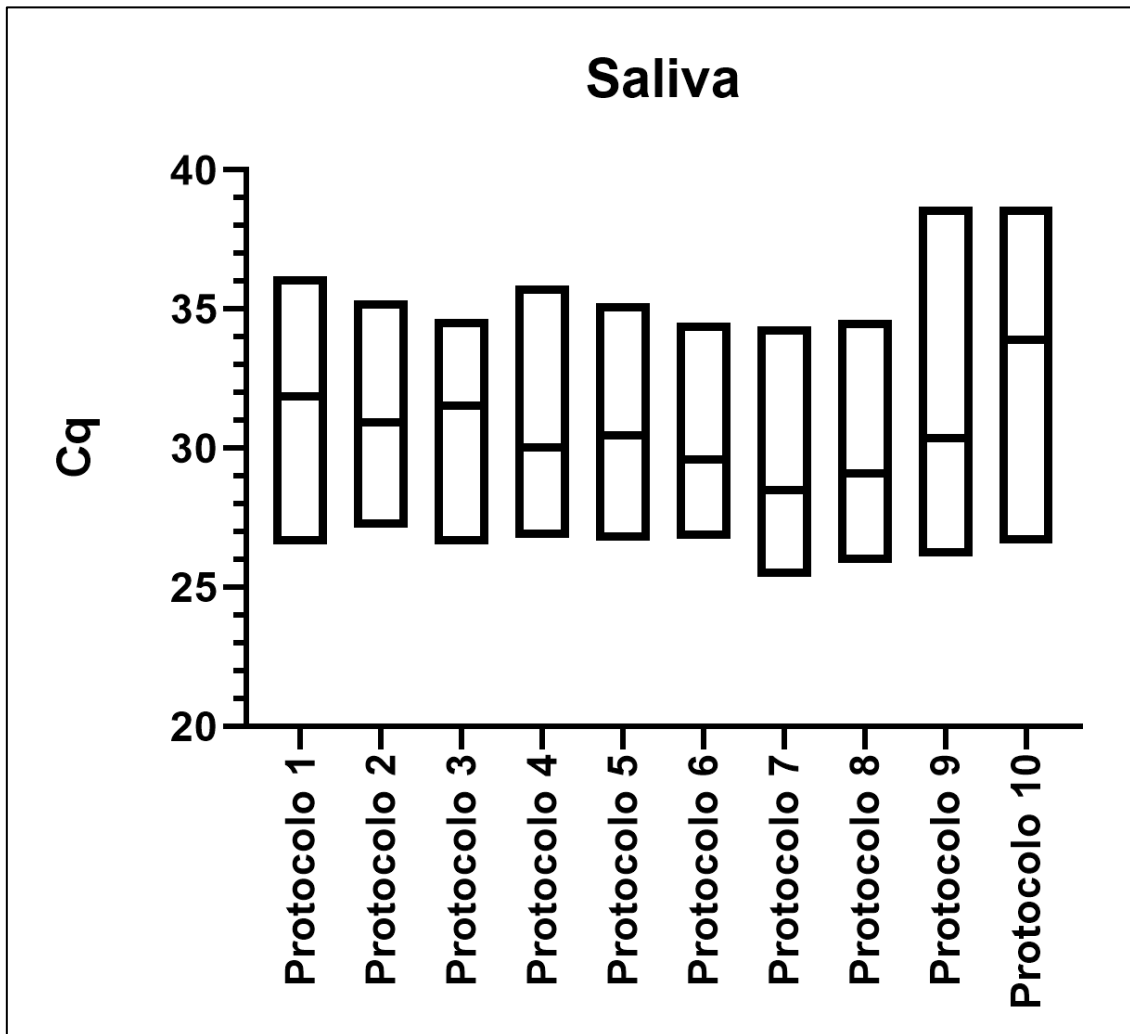
**Figura 14.** Comparação entre os procedimentos manual e automático sobre a concentração de DNA do PCV obtida por qPCR por tipo de amostra e execução do protocolo desenvolvido (*in house*). Considerada diferença estatística (\*)  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon

Os resultados da análise de pureza (razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis) dos protocolos acima por tipo de amostra estão representados na **Figura 15**.



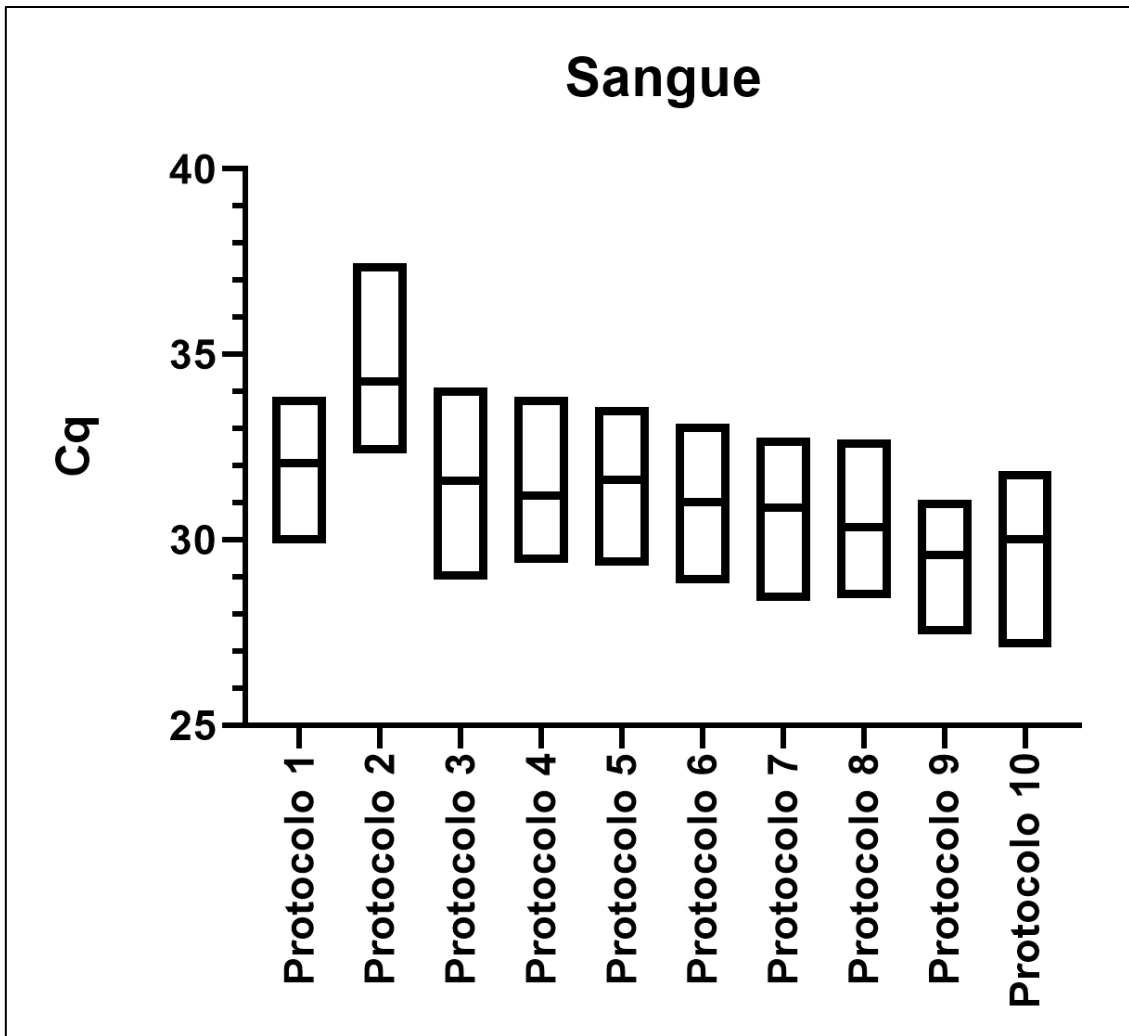
**Figura 15.** Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e execução do protocolo desenvolvido (*in house*). Considerada diferença estatística (\*)  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon

As adaptações do protocolo padrão “*in house*” (Protocolo 1) analisadas para cada tipo de amostra estão representadas nas **Figuras 16, 17 e 18**.

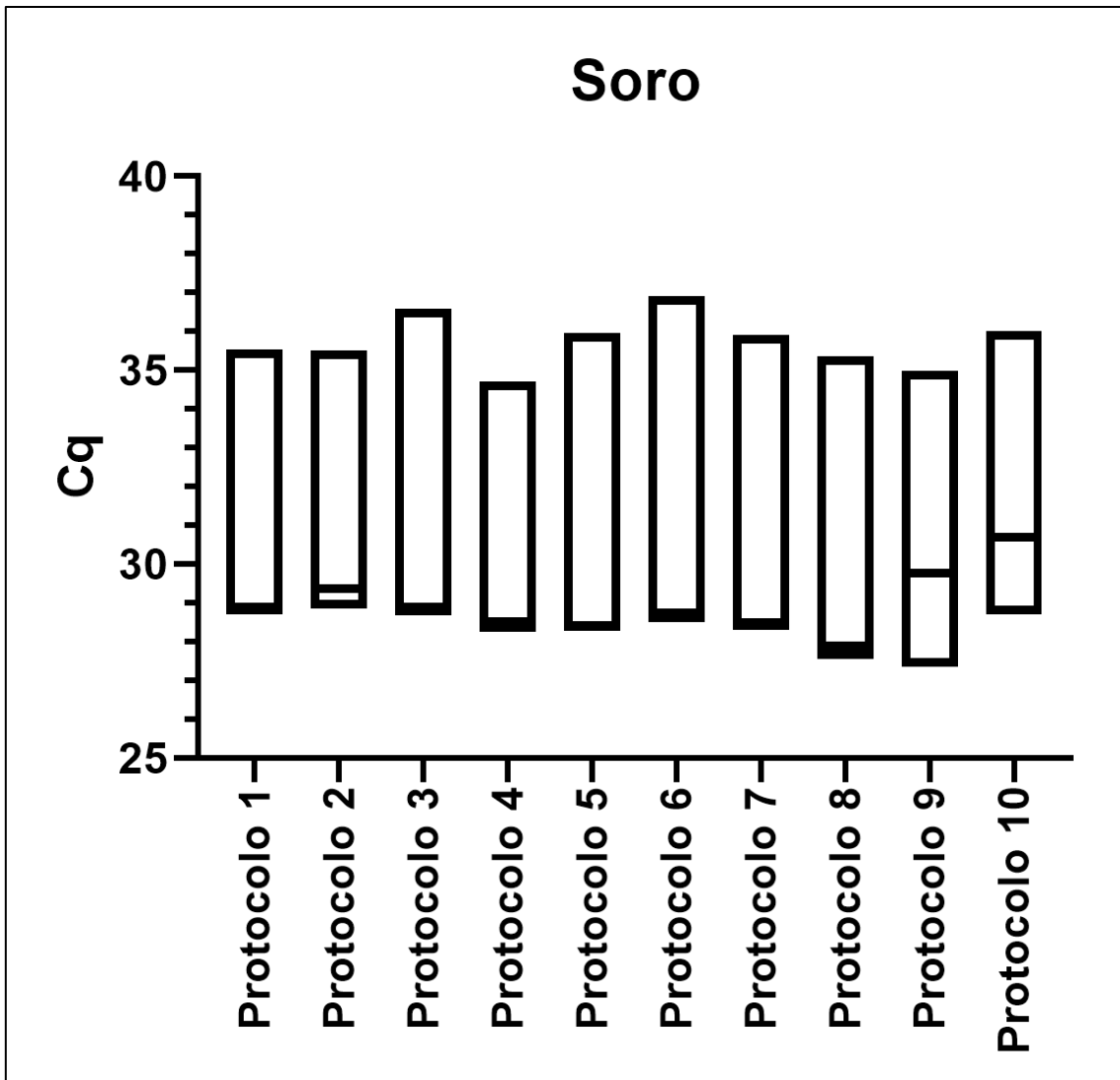


**Figura 16.** Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de salivas, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis



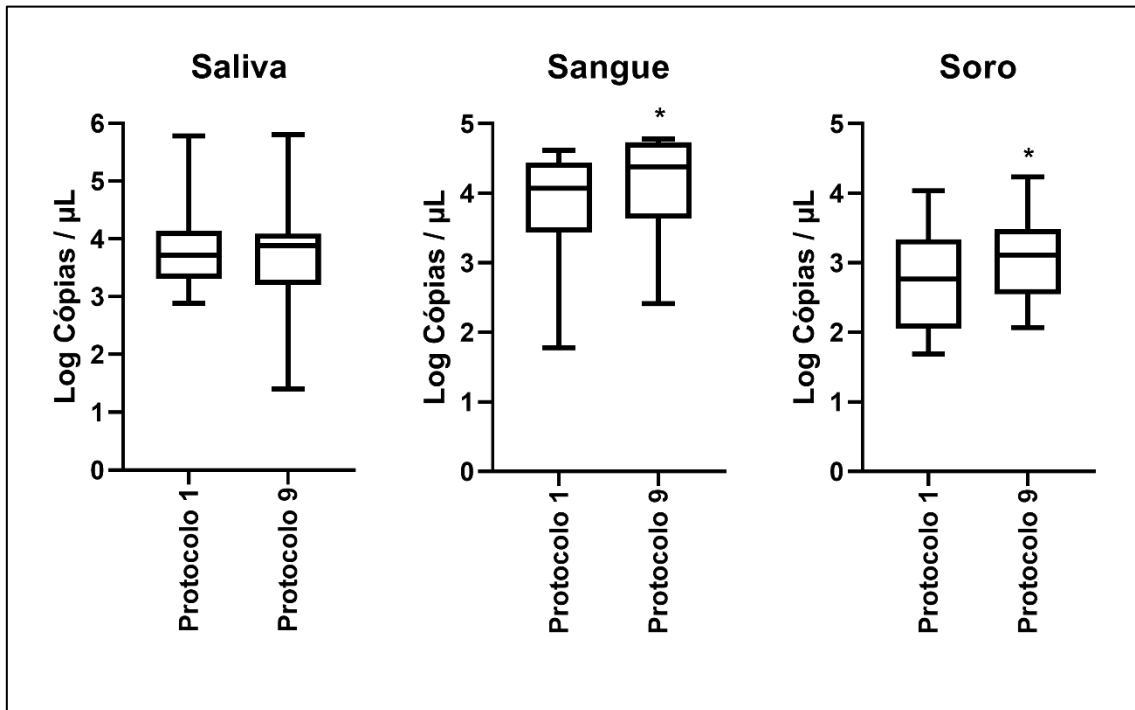


**Figura 17.** Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de sangue total, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis



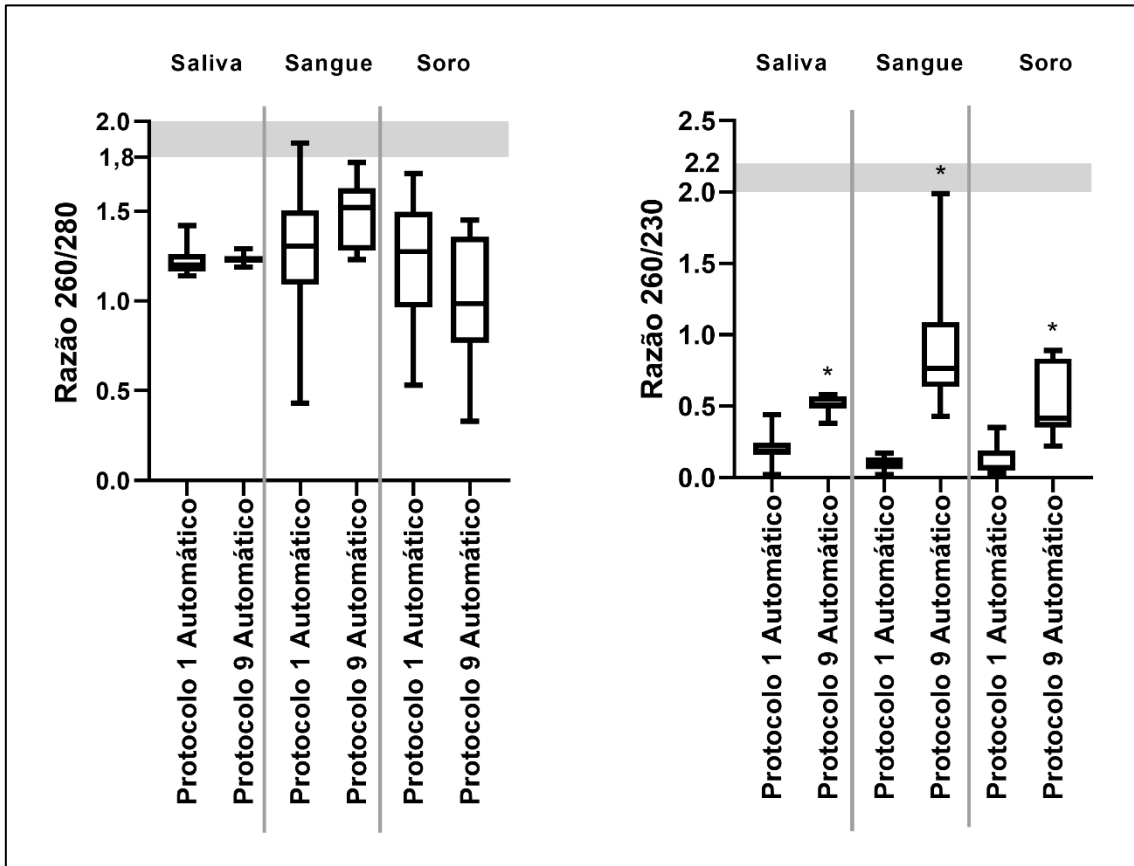
**Figura 18.** Gráfico de distribuição dos valores de Cq obtidos por qPCR para PCV a partir de amostras de soro, por tipo de protocolo. Considerada diferença estatística  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Kruskal-Wallis

A comparação das concentrações de DNA de PCV quantificadas pela qPCR obtidos para cada tipo de amostra e para os protocolos de extração desenvolvidos (*in house*) Protocolo 1 (padrão) e Protocolo 9 estão apresentados na **Figura 19**.



**Figura 19.** Gráfico de distribuição da concentração de DNA do PCV obtida por qPCR de amostras de PCV por tipo de amostra e protocolo de extração desenvolvido (*in house*). Considerada diferença estatística (\*)  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon

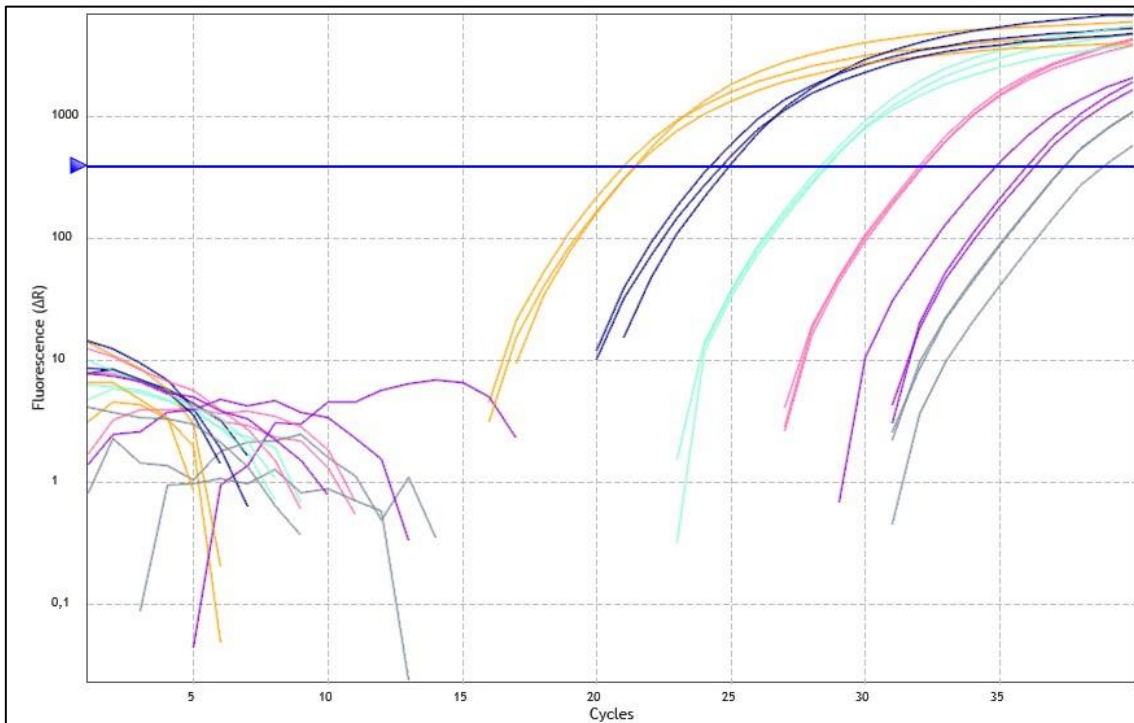
Das análises de pureza (razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis), para cada tipo de amostra e para os protocolos de extração desenvolvidos (*in house*) Protocolo 1 (padrão) e Protocolo 9 estão representados na **Figura 20**.



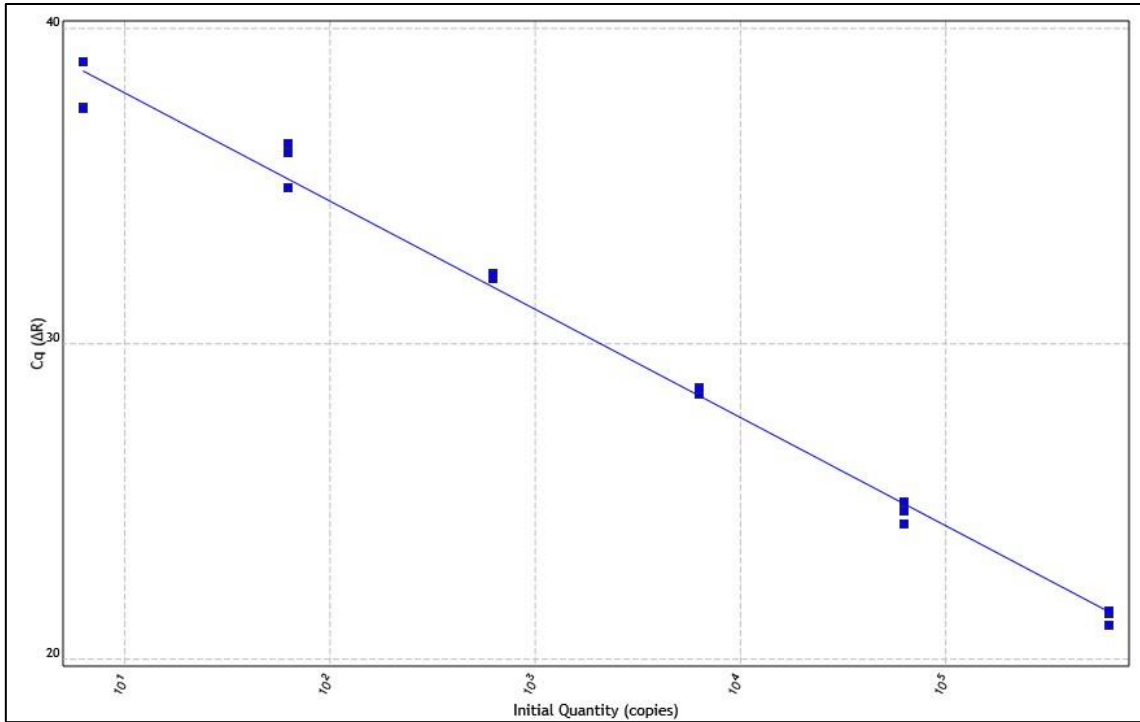
**Figura 20.** Distribuição dos valores obtidos pela razão 260/280 e 260/230 por espectrofotometria UV-Vis dos DNAs extraídos por tipo de amostra e tipo de protocolo desenvolvido (*in house*). Considerada diferença estatística (\*)  $p < 0,05$  entre o método de extração dentro do mesmo tipo de amostra, pelo teste Wilcoxon

## 6.4 Curva de eficiência

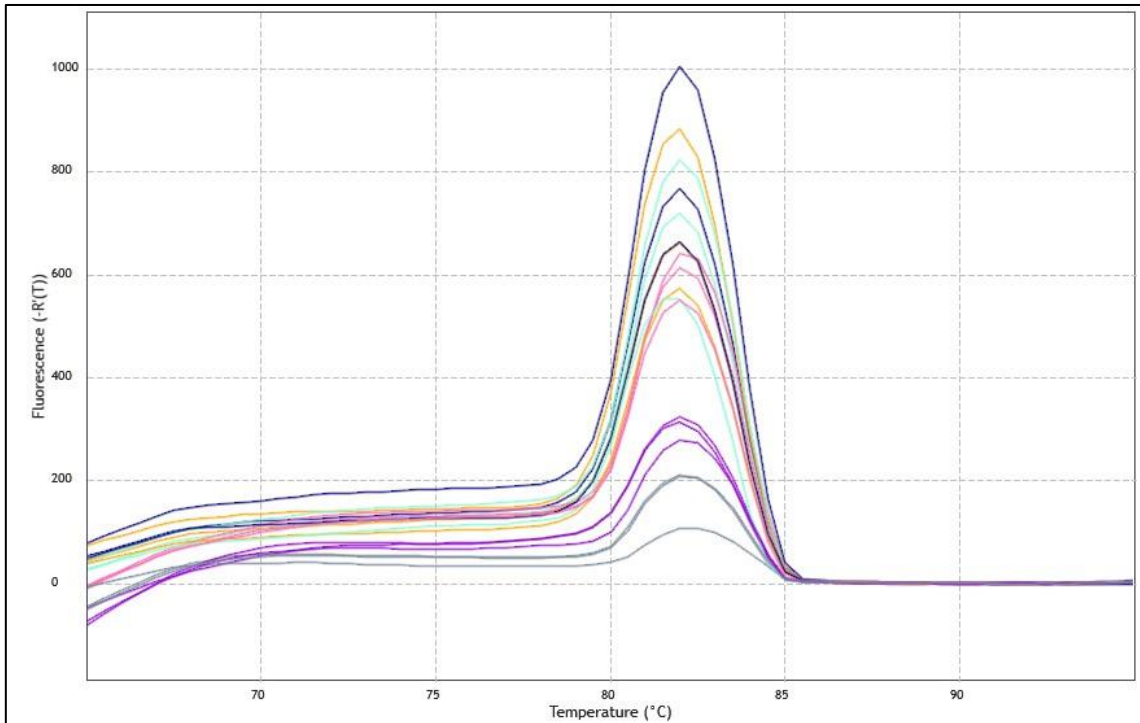
O gráfico da curva de amplificação obtido na reação de qPCR, a partir das diluições de amostra de saliva, está apresentado na **Figura 21**. Os dados de curva foram: eficiência de 95,6%, coeficiente de correlação (r) igual a 0,99, slope -3,431 (**Figura 22**), com a formação de um pico único com a Tm entre 82°C e 82,5 °C (**Figura 23**).



**Figura 21.** Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva, do puro até o ponto 10<sup>-6</sup>, em ordem decrescente de diluição

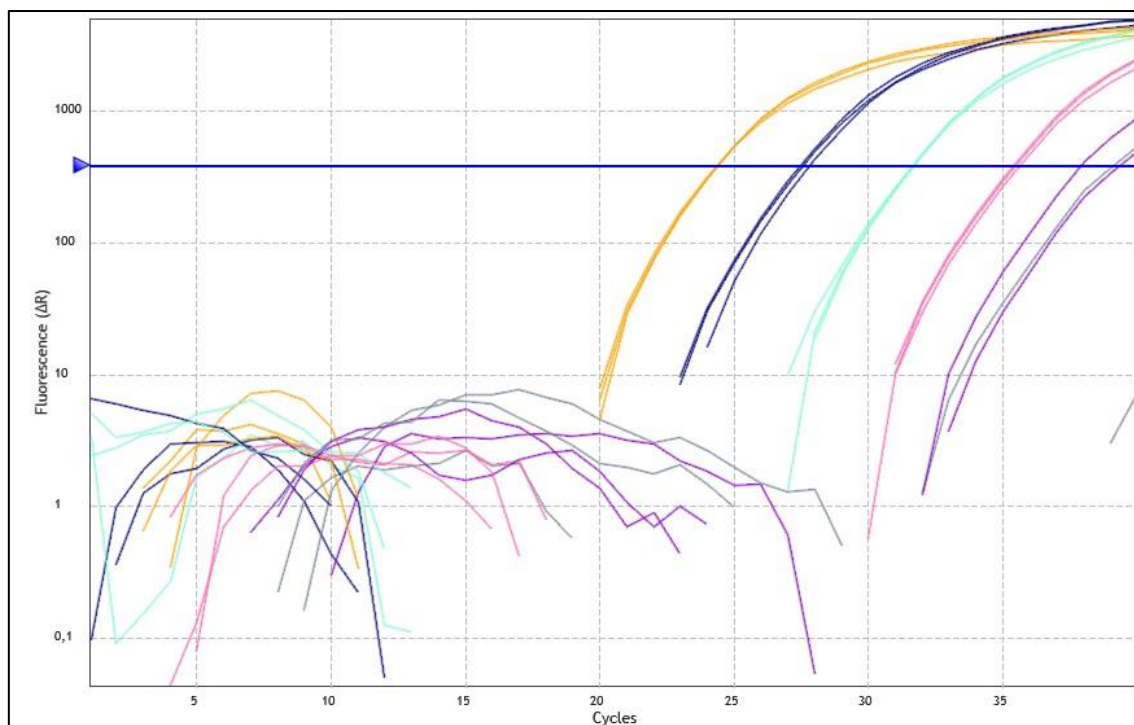


**Figura 22.** Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva, com seis pontos (amostra pura até diluição 10<sup>-6</sup>)

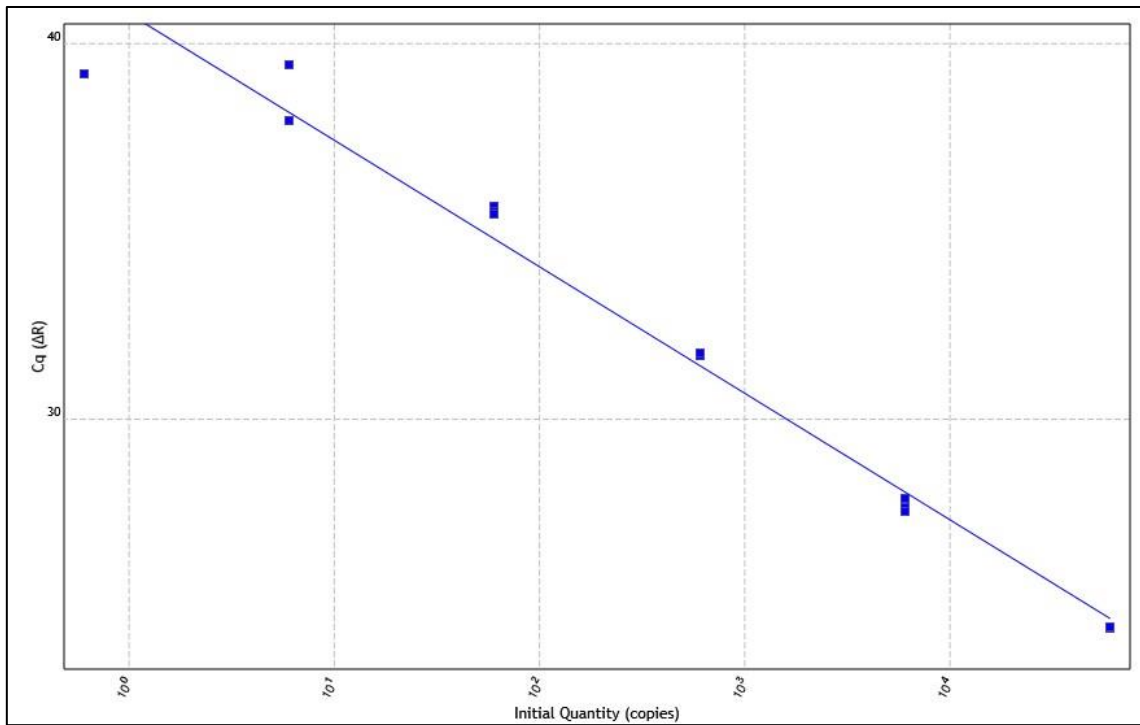


**Figura 23.** Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de saliva

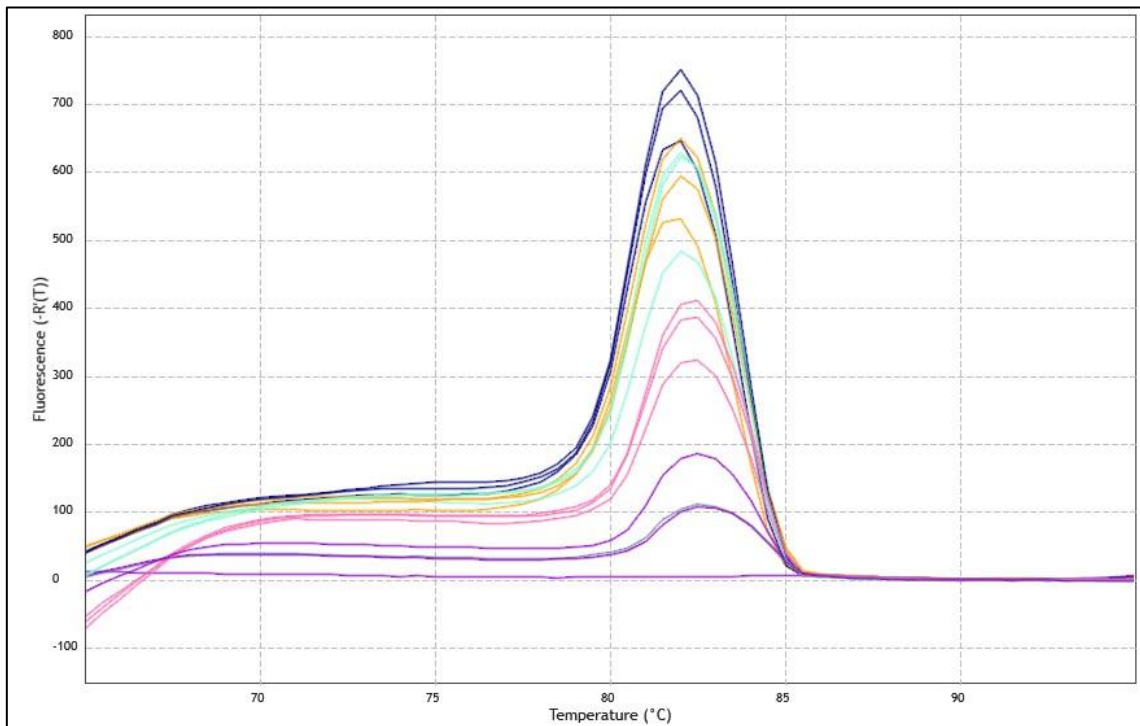
Para as diluições a partir de amostra de sangue total, está demonstrado na **Figura 24** o gráfico da curva de amplificação obtido por qPCR para PCV. Os dados de curva foram: eficiência de 98,08%, coeficiente de correlação (r) igual a 0,97, slope -3,369 (**Figura 25**), com a formação de um pico único com a Tm entre 82°C e 82,5 °C (**Figura 26**).



**Figura 24.** Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total, do puro até o ponto  $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição



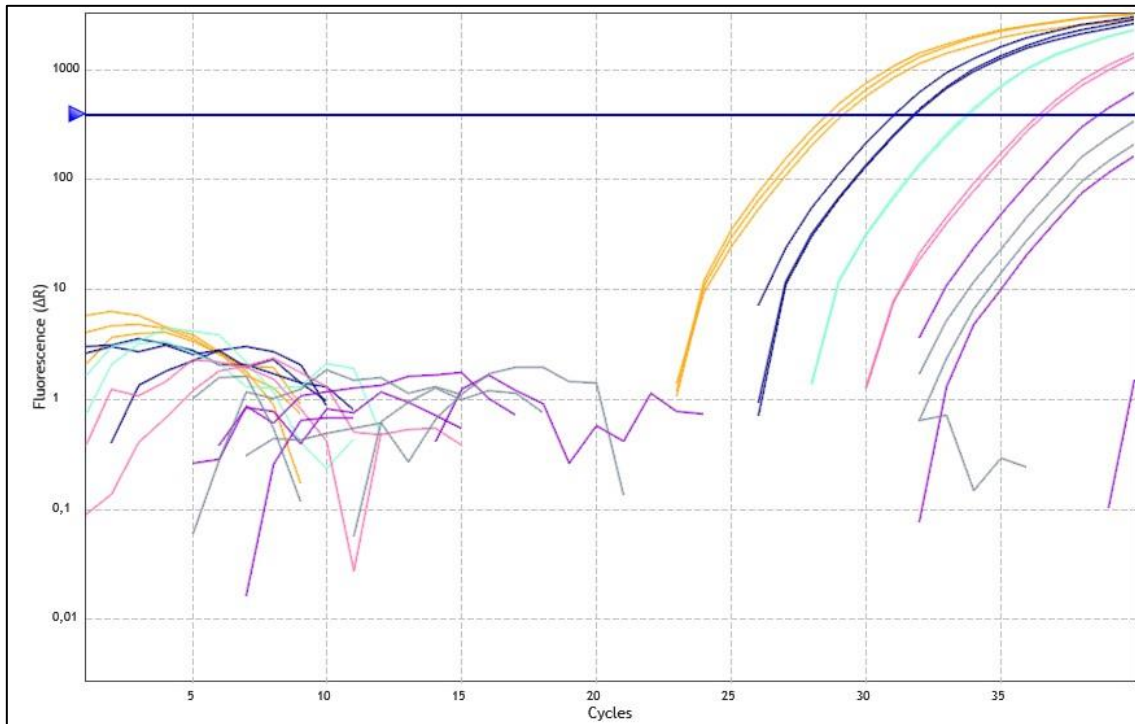
**Figura 25.** Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total, com seis pontos (amostra pura até diluição  $10^{-6}$ )



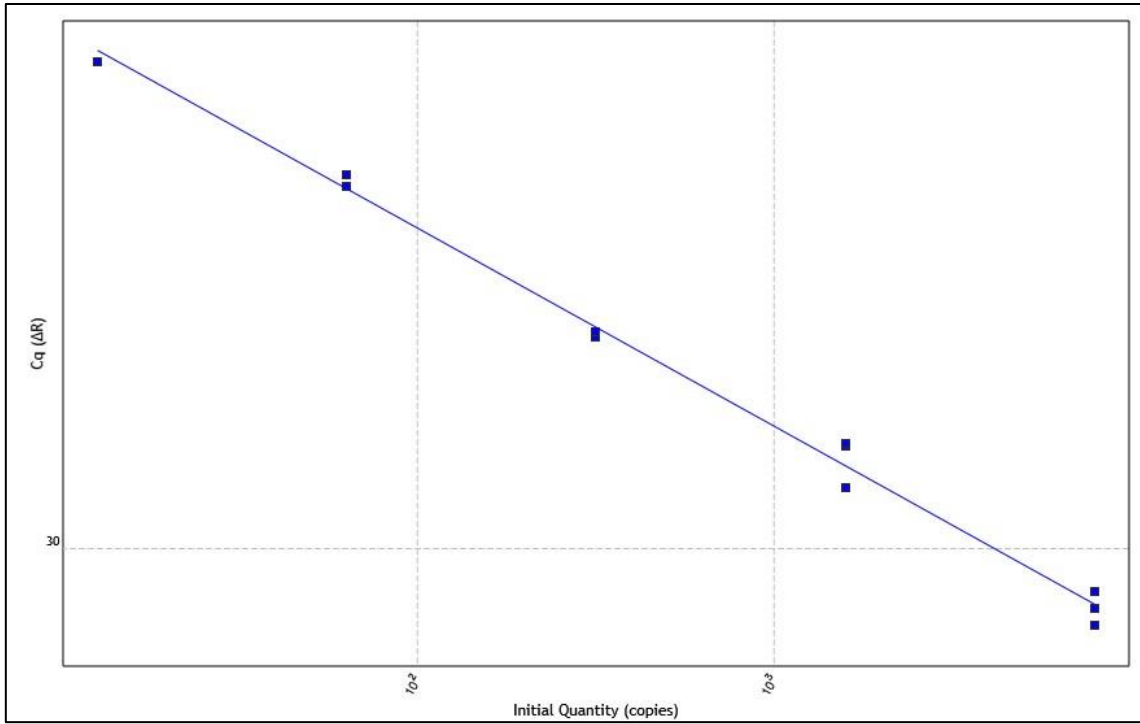
**Figura 26.** Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de sangue total



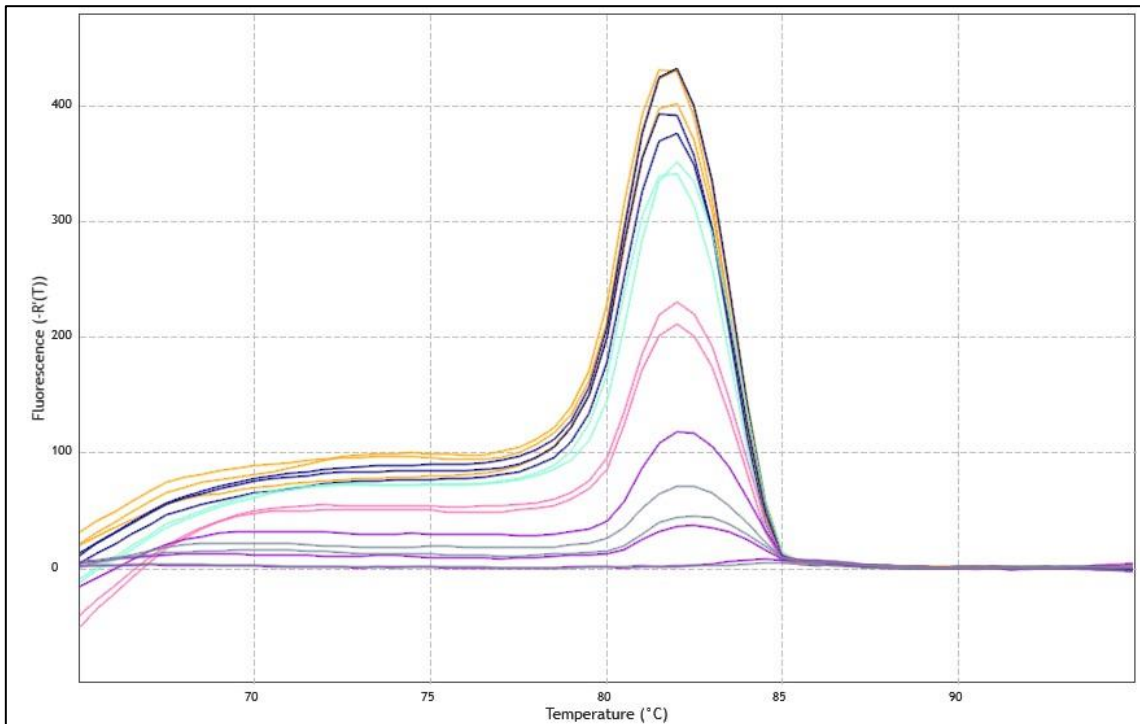
O gráfico da curva de amplificação obtido na reação de qPCR, a partir das diluições de amostra de soro está apresentado na **Figura 27**. Os dados de curva foram: eficiência de 91,1%, coeficiente de correlação (r) igual a 0,99, slope -3,553 (**Figura 28**), com a formação de um pico único com a Tm entre 81,5°C e 82,5 °C (**Figura 29**).



**Figura 27.** Gráfico da curva de amplificação por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro, do puro até o ponto  $10^{-6}$ , em ordem decrescente de diluição



**Figura 28.** Gráfico da curva de eficiência por qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro, com seis pontos (amostra pura até diluição  $10^{-6}$ )



**Figura 29.** Gráfico da curva de dissociação obtida através da qPCR para PCV a partir de diluições de amostra de soro

## 7. DISCUSSÃO

Para validação do protocolo desenvolvido, inicialmente foram feitos testes utilizando o protocolo referência Possebon et al. (2022), seguido de modificações com objetivo de melhorar a concentração de DNA do PCV que foi extraído. Apesar da amplificação observada na amostra A, extraída pelo protocolo referência, foram observadas dificuldades no processo de magnetização e homogeneização das amostras durante as etapas de separação e lavagens do protocolo, com a formação de um agregado de partículas na forma de um aglomerado altamente viscoso, sugerindo que os volumes das soluções estivessem inadequados para o tipo de amostra. Uma alternativa proposta para o problema encontrado foi o aumento do volume das soluções utilizadas, para realizar a diluição da amostra a fim de diminuir a agregação das partículas magnéticas. Uma vez que na literatura, diversos protocolos para extração de DNA em amostras de sangue total utilizam volumes altos de solução (PSIFIDI et al., 2015), de forma semelhante aos utilizados no protocolo proposto (STROHMEIER et al., 2015), pode-se observar uma melhora na eficiência do protocolo pela presença de amplificação em ambas as amostras testadas.

Com o objetivo de aumentar a concentração de DNA do PCV extraído pelo protocolo desenvolvido, foram realizados testes de volumes de partículas magnéticas a fim de avaliar o impacto desse componente no processo de purificação do DNA. Foi observado que o valor de Cq de ambas as amostras testadas apresentaram diminuição de forma crescente, quando o volume de partículas magnéticas utilizado no protocolo *in house* foi aumentado. Com o volume de 80  $\mu$ L de partículas, o valor de Cq de ambas as amostras foram similares ao dos respectivos controles. Com o protocolo adequado para extração de DNA do PCV a partir de amostras de sangue total foram realizados testes para avaliação da metodologia em amostras de soro e saliva. Para as amostras de soro não foram observadas diferenças significativas entre a utilização de 60  $\mu$ L e 80  $\mu$ L de partículas magnéticas, após a comparação entre os valores de Cqs, sendo esses valores semelhantes aos obtidos pelos controles extraídos pelo kit de coluna de sílica. O protocolo foi utilizado na extração de amostras de salivas para avaliação da eficiência do mesmo. Em todas as amostras de saliva o protocolo proposto apresentou sucesso na extração de DNA do PCV com valores de Cqs similares aos controles positivos das amostras analisadas, podendo concluir que o volume de 80 $\mu$ L de partículas magnéticas é adequado para extração do PCV para os três tipos de amostras.

Na etapa de padronização do protocolo, inicialmente foi feita a comparação dos valores de concentração de DNA do PCV (log de cópias) obtidos através da técnica de qPCR para cada método de extração, pela análise de correlação, a fim de analisar a associação entre os protocolos. Para os três tipos de amostras analisadas foi observada alta correlação positiva entre os protocolos. Em relação às amostras de saliva, pelos gráficos de dispersão (**Fig. 2**, **Fig. 3** e **Fig. 4**) pode-se observar melhor correlação entre os protocolos (Beads x Coluna, Beads x MM e Coluna x MM), em comparação aos outros dois tipos de amostras ( $r = 0,96$ ,  $r = 0,99$  e  $r = 0,97$ , respectivamente, com valores de  $P < 0,0001$ ). Resultados similares são observados em relação às amostras de sangue total submetidas aos mesmos métodos de extração (**Fig. 5**, **Fig. 6** e **Fig. 7**) ( $r = 0,92$ ,  $r = 0,91$  e  $r = 0,94$ , valores de  $p < 0,0001$ ). Para as amostras de soro também foi observada correlação positiva significativa ( $r = 0,82$ ,  $r = 0,80$  e  $r = 0,96$ , com valores de  $p < 0,0001$ ) entre os protocolos, representada nos gráficos de dispersão (**Fig. 8**, **Fig. 9** e **Fig. 10**), permitindo concluir que o protocolo proposto teve resultados similares aos kits comerciais EasyPure® Blood Genomic DNA KIT e MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit no isolamento do DNA do PCV nos três tipos de amostras.

A partir da análise comparativa entre a mediana da concentração de DNA do PCV obtida para cada método de extração e tipo de amostra (**Fig. 11**), foi possível observar que houveram diferenças estatísticas em relação à quantificação do vírus entre os três métodos. Para as amostras de saliva, o protocolo *in house* (mediana = 4,744) apresentou menor concentração de DNA do PCV, em relação aos demais métodos comerciais de partículas magnéticas (MM) (mediana = 4,833) e coluna de sílica (mediana = 4,817), os quais não se diferenciaram estatisticamente. Em relação às amostras de sangue total, o kit comercial de partículas magnéticas apresentou diferença estatística, com menor desempenho em relação à concentração de DNA do PCV (mediana = 2,748), em relação aos demais. Entre os protocolos de partículas magnéticas *in house* (mediana = 3,009) e kit comercial de coluna de sílica (mediana = 3,250) não foi encontrada diferença estatística. Para as amostras de soro, o método comercial de partículas magnéticas apresentou diferença estatística entre os demais, com maior concentração de DNA do vírus (mediana = 4,409) em relação ao protocolo *in house* (mediana = 3,696) e o método comercial de coluna de sílica (mediana = 3,986).

O protocolo *in house* apresentou menores concentrações de DNA do PCV em amostras de saliva e soro, apresentando sensibilidade menor na extração do vírus em amostras com baixa carga viral, em relação aos protocolos comerciais. Podendo ser observado (**Fig. 11**) que para os dois tipos de amostras (saliva e soro), o protocolo desenvolvido apresentou menores valores mínimos e máximos em comparação aos métodos comerciais. Uma característica em comum dentre tais amostras é baixa celularidade. Uma vez que o PCV é um patógeno intracelular, cujo tropismo está relacionado a infecção de células da linhagem monocítica e linfoblastos (NAUWYNCK et al., 2012) em amostras com pouca ou ausência dessas células, a detecção pode ser mais difícil. Em contrapartida, o protocolo *in house* apresentou ótimo desempenho na extração de DNA do PCV a partir de amostras de sangue total, apesar da complexidade da amostra. Outros autores obtiveram ótimos resultados a partir de protocolos *in house* baseados em partículas magnéticas em amostras de sangue total para outros patógenos (PSIFIDI et al., 2015.) Apesar da diferença encontrada entre as concentrações de DNA do PCV obtidas pelos métodos comerciais comparadas ao protocolo desenvolvido, para as amostras de saliva a diferença encontrada, apesar de estatisticamente significativa, foi mínima, corroborando com os resultados de alta correlação anteriormente observados, da mesma forma para as amostras de soro, permitindo concluir que o protocolo desenvolvido pode ser aplicado para extração do PCV para os três tipos de amostra.

Em relação aos kits comerciais, a metodologia baseada em coluna de sílica apresentou ótima eficiência na extração de DNA do PCV para os três tipos de amostras. Em contrapartida, o protocolo baseado em partículas magnéticas apresentou menor concentração de DNA do PCV em amostras de sangue total. Tal fato pode estar associado com as propriedades da amostra. O sangue é constituído de diversos componentes como as hemácias, sendo o grupo heme (hemoproteínas) um dos seus principais constituintes. Durante o processo de purificação de ácidos nucleicos, pode ocorrer a co-purificação do grupo heme pelas partículas magnéticas, promovendo menor ligação ao DNA (WITT, et al., 2012). Podendo a diferença entre o volume e a concentração de partículas magnéticas utilizadas nos protocolos, *in house* e comercial, ser o indicativo da divergência encontrada nesse estudo, uma vez que o volume de partículas utilizado no protocolo comercial é 4 vezes menor.

A pureza do DNA pode ser analisada utilizando leituras de absorvância a 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm de acordo com a Lei de Beer-Lambert, que leva em

consideração a detecção do espectro de contaminantes na amostra. O valor de 1,8 para para razão 260/230 representam alta pureza de DNA ou RNA (MATHAY et al., 2016). Em relação aos parâmetros de pureza analisados nesse experimento, os resultados das análises por espectrofotometria estão representados na **Figura 12** (razão 260/280) e **Figura 13** (razão 260/230).

Como descrito anteriormente, valores próximos a 1,8 para razão 260/280 são associados a maior pureza de DNA. Para as amostras de saliva e soro, pelos métodos de extração empregados, foi encontrado uma baixa pureza para o DNA extraído, os quais não apresentaram diferença estatística significativa (saliva  $p = 0,1466$  e soro  $p = 0,1466$ ). Desta maneira, as etapas de lise e lavagens podem não ter sido eficientes na remoção das proteínas presentes nas amostras, uma vez que valores abaixo de 1,8 a 280 nm são indicativos de contaminação por proteínas (MATHAY et al., 2016). Como também, amostras que possuem como características a pouca ou até a ausência de celularidade, após o processo de extração apresentam concentrações baixas de ácidos nucleicos, o que pode promover erros de leitura, justificando também a baixa razão encontrada (Thermo Scientific, 2013).

Foram observadas diferenças estatísticas entre os métodos de extração ( $p < 0,0001$ ), em relação às amostras de sangue total. Os protocolos baseados em partículas magnéticas apresentaram menores valores de pureza em relação ao protocolo comercial de coluna de sílica. A baixa eficiência do processo de remoção dos vestígios celulares do protocolo desenvolvido foi vista anteriormente para amostras de saliva e soro. Entretanto, como a amostra de sangue total possui maior quantidade de material celular, a remoção desses compostos torna-se mais difícil. Para a razão 260/230, foram observadas diferenças estatísticas em todos os métodos, nos três tipos de amostras (saliva  $p < 0,0001$ , sangue  $p < 0,0001$  e soro  $p < 0,0001$ ). Os três protocolos de extração apresentaram pureza abaixo do esperado, podendo estar associados a vestígios de compostos fenólicos e guanidina, que podem ser detectados na absorvância à 230 nm (SALONEN et al., 2010) (Thermo Scientific, 2013).

Como alternativas para as limitações encontradas do protocolo desenvolvido nesse trabalho, adaptações em relação a execução do protocolo foram avaliadas. Uma hipótese para a baixa pureza observada nas razões 260/280 e 260/230 está associada a realização do processo de extração em um único tubo, onde resquícios de contaminantes e possíveis inibidores presentes durante as etapas da extração podem se acumular. Como alternativa, o protocolo *in house* foi adaptado para sua execução de forma automática

utilizando o equipamento de KingFisher Flex System. A extração automatizada consiste na ação de um bloco magnético composto por 96 hastes, cuja função é manipular as partículas magnéticas presente na solução de lise durante o processo de extração. Como forma de proteção ao bloco magnético são utilizados pentes plásticos que funcionam como ponteiras, os quais entrarão em contato direto com as soluções. O equipamento de extração tem capacidade de manipulação de até 96 amostras simultaneamente, tendo o processo realizado em placas, sendo necessário a utilização de uma placa para cada etapa/solução do protocolo.

Foi realizada a comparação entre as medianas dos valores de concentração de DNA do PCV obtidos através da técnica de qPCR para o protocolo *in house* manual e automático, para cada um dos três tipos de amostra (**Fig. 14**). Observa-se diferença estatística na quantificação do vírus entre os protocolos apenas para amostras de sangue total ( $p < 0,0001$ ), com menor concentração de DNA do PCV apresentada pelo protocolo *in house* automático (mediana = 4,153) quando comparado ao protocolo manual (mediana = 4,412). Uma das diversas vantagens da automação de procedimentos laboratoriais é a rapidez de execução. O tempo necessário para a extração automática das 90 amostras utilizadas nesse experimento foi de 32 minutos, sendo este o tempo médio para a execução manual do mesmo protocolo, na extração de 8 amostras. Para implementação do protocolo desenvolvido no equipamento, foram necessárias adaptações no método original para adequação, sendo a quantidade e velocidade de homogeneização um dos parâmetros modificados. Tendo em vista a complexidade da amostra, essas alterações podem ter influenciado na sensibilidade do protocolo. Resultado similar foi observado por Aebischer et al. (2014) com a comparação entre a extração manual e duas plataformas automatizadas, para extração de dois vírus RNAs a partir de amostras de sangue total.

Os parâmetros de pureza entre os protocolos *in house* foram determinados (**Fig. 15**). Para a razão 260/280 foram observadas diferenças estatísticas entre os protocolos para as amostras de saliva e sangue total ( $p = 0,0122$  e  $p = <0,0001$ , respectivamente), com o protocolo manual apresentando melhores valores de pureza em relação ao automático. Apesar da diferença estatística encontrada entre os protocolos para as amostras de sangue, o protocolo automático apresentou valores de pureza dentro do esperado, com 75% dos valores entre 1,8 a 2. Para as amostras de saliva, apesar do protocolo manual ser estatisticamente diferente, o mesmo apresentou maior variação de valores (mínimo =

1,060 e máximo = 2,6) em relação ao automático (mínimo = 1,14 e máximo = 1,6), apresentando 25% de seus valores de pureza abaixo do esperado. Para a razão 260/230 houve diferença estatística entre os protocolos para as amostras de saliva ( $p = <0,0001$ ) e soro ( $p = <0,0001$ ), com a execução do protocolo automático apresentando melhores valores de pureza. Corroborando com a hipótese da persistência de possíveis contaminantes gerados durante o processo de extração, os quais podem estar associados com a baixa pureza observada na execução do protocolo manual.

Com os resultados promissores a partir da execução automática do protocolo desenvolvido, tendo observado melhora nos valores da razão 260/230, foi determinada a utilização do protocolo automático para os experimentos subsequentes. Foram testadas nove adaptações do protocolo *in house*, denominado Protocolo 1, para avaliação de diferentes processos de lavagem, descritos anteriormente no tópico “4.7.2 Avaliação dos parâmetros de lavagem” “Quadro 2. Adaptações avaliadas do protocolo desenvolvido (in house)”. Foi realizada a comparação entre os valores de C<sub>q</sub> obtidos através da técnica de qPCR para PCV para os três tipos de amostra (**Fig 16, Fig 17 e Fig. 18**). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os protocolos avaliados para amostras de saliva, sangue total e soro. Entretanto, nota-se que para todas as amostras dos três tipos, os menores valores de C<sub>q</sub> foram obtidos pelos protocolos que apresentaram três etapas de lavagem (Protocolo 5 ao Protocolo 10). O Protocolo 9 foi considerado o mais adequado para o objetivo de determinar um protocolo único otimizado para os três tipos de amostra.

Foi realizada a análise comparativa entre a mediana da concentração de DNA do PCV obtida para cada protocolo de extração (Protocolo 1 e Protocolo 9) e tipo de amostra (**Fig.19**). Para amostras de saliva não foram encontradas diferenças estatísticas entre os protocolos ( $p = 0,1982$ ). Foram encontradas diferenças estatísticas entre os protocolos automatizados *in house* em amostras de sangue total e soro. Para amostras de sangue, o Protocolo 9 apresentou maior concentração de DNA do PCV (mediana = 4,380) em relação ao Protocolo 1 (mediana = 4,070). Resultado similar ao encontrado para amostras de soro, com maior quantificação, o Protocolo 9 (mediana = 3,110) em comparação ao Protocolo 1 (mediana= 2,765).

Em relação aos parâmetros de pureza entre os protocolos *in house* automatizados (**Fig. 20**), para a razão 260/280 não foram observadas diferenças estatísticas entre os protocolos para as amostras de saliva ( $p = 0,2266$ ) sangue total ( $p = 0,1563$ ) e soro ( $p =$



0,3828) com ambos os protocolos apresentando pureza abaixo dos valores ideais. Para a razão 260/230 foram encontradas diferenças estatísticas entre os protocolos para os três tipos de amostras, saliva ( $p= 0,0078$ ), sangue total ( $p = 0,0078$ ) e soro ( $p= 0,0008$ ), com o Protocolo 9 apresentando melhores valores de pureza em relação ao Protocolo 1. Apesar da baixa pureza encontrada em ambos os protocolos, a adição da terceira etapa de lavagem contida no Protocolo 9 forneceu melhores valores da razão 260/230 observados em todos os experimentos realizados nesse estudo.

O Protocolo 9 apresentou alta eficiência para extração de DNA do PCV nos três tipos de amostra. A eficiência do método de extração *in house* foi determinada através da construção de uma curva padrão constituída de seis diluições, utilizando uma amostra positiva de cada um dos três tipos, com maior quantificação para PCV disponível. Para a saliva e sangue total, as respectivas curvas foram construídas com diluições seriadas de razão 10, sendo esperado o aumento do valor do Cq em 3,33 unidades após cada diluição. Para soro, devido à ausência de amostra com alta concentração de PCV, as diluições seriadas foram preparadas na razão 5, com o aumento dos valores de Cq em 2,32 unidades após cada diluição. Assim, todas as curvas apresentaram valores satisfatórios de eficiência (acima de 90%) (**Fig. 22, Fig. 25 e Fig. 28**) e de valores de coeficiente de correlação: curva saliva  $r = 0,99$ , curva sangue total  $r = 0,97$  e curva soro  $r = 0,99$ . Apresentando especificidade da reação através da análise da curva de dissociação (**Fig. 23, Fig. 26 e Fig. 29**), com a presença de picos únicos entre 81,5°C a 82,5 °C.

## 8. CONCLUSÕES

Os protocolos propostos nesse estudo apresentaram ótimos resultados em relação à extração de DNA do PCV em amostras de saliva, sangue total e soro, quando comparados com os métodos comerciais analisados.

Ambos os protocolos avaliados (Protocolo 1 e Protocolo 9) são aplicáveis para a extração de DNA do PCV nos três tipos de amostras analisadas. A quantificação do PCV pela técnica de qPCR foi realizada com parâmetros eficientes, apesar da presença de contaminantes ou proteínas em ambos os protocolos executados, não interferindo na qualidade analítica da técnica.

Os protocolos desenvolvidos nesse trabalho permitem execução manual e automática, podendo ser realizado conforme a disponibilidade dos recursos disponíveis. O protocolo manual *in house* apresenta vantagem na execução em pequenas amostras.

Os protocolos de extração propostos poderão ser utilizados para extração de DNA de outros vírus.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBISCHER, Andrea; BEER, Martin; HOFFMANN, Bernd. Development and validation of rapid magnetic particle based extraction protocols. **Virology journal**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2014.

ALLAN, Gordon M.; ELLIS, John A. Porcine circoviruses: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 1, p. 3-14, 2000.

ALLAN, G. M. et al. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, n. 1, p. 3-10, 1998.

BAO, F. et al. Retrospective study of porcine circovirus type 2 infection reveals a novel genotype PCV 2f. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 432-440, 2018.

BERENSMEIER, Sonja. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495-504, 2006.

BIRNBOIM, H. Cv; DOLY, Janine. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic acids research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

CARPI, M. Francesco et al. Human DNA extraction methods: patents and applications. **Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2011.

CHACON CORTES, Diego Fernando; GRIFFITHS, Lyn. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, v. 2014, n. 2, p. 1-9, 2014.

CUATRECASAS, Pedro; WILCHEK, Meir; ANFINSEN, Christian B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 61, n. 2, p. 636, 1968.

CRUZ, T.F.; KANASHIRO, T.M.; CASTRO, A.M.M.G.; BALDIN, C.M.; RICHTZENHAIN, L.J.; ARAUJO JUNIOR, J.P. Um ELISA em sanduíche de duplo

anticorpo baseado no circovírus suíno tipo 2 (PCV2) propagado em cultura de células para detecção de anticorpos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.**, v.36, p.1171-1177, 2016.

CRUZ, T. F. et al. Diminuição da carga viral do circovirus suíno após vacinação com Circumvent PCV em uma granja comercial. **A Hora Veterinária**, p. 22-26, 2014.

CRUZ, Taís Fukuta. Quantificação do circovírus suíno e sua correlação com o ganho de peso de leitões. 2006.

CSEKE, Leland J. et al. (Ed.). **Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine.** CRC press, 2011.

DAIRAWAN, Mariyam; SHETTY, Preetha J. The evolution of DNA extraction methods. **America Journal of Biomedical Science and Research**, v. 8, n. 1, p. 39-46, 2020.

DAVIES, Brendan et al. Diagnostic phylogenetics reveals a new porcine circovirus 2 cluster. **Virus research**, v. 217, p. 32-37, 2016.

DAVIES, Martin J. et al. Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent. **Analytical biochemistry**, v. 262, n. 1, p. 92-94, 1998.

DOYLE, Jeffrey. DNA protocols for plants. In: **Molecular techniques in taxonomy.** Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 283-293.

DUPONT, K. et al. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. **Veterinary microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 56-64, 2008.

EL-AAL, Abd et al. Comparative study of five methods for DNA extraction from whole blood samples. **International Journal of Health Science**, v. 3, n. 1, 2010.

FERSHI, AR. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. **New York: Freeman WH & Co.**; 1999.

FIRTH, Cadhla et al. Insights sobre a história evolutiva de um patógeno de gado emergente: circovírus suíno 2. **Journal of virology**, v. 83, n. 24, pág. 12813-12821, 2009.

FRANZO, Giovanni et al. Phylodynamic analysis of porcine circovirus type 2 reveals global waves of emerging genotypes and the circulation of recombinant forms. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 100, p. 269-280, 2016.

FRANZO, Giovanni et al. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution. **Veterinary Microbiology**, v. 178, n. 1-2, p. 158-162, 2015.

FRANZO, Giovanni; SEGALÉS, Joaquim. Porcine circovirus 2 (PCV-2) genotype update and proposal of a new genotyping methodology. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0208585, 2018.

HARDING, John CS; CLARK, Edward G. Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Swine Health and Production**, v. 5, n. 5, p. 201-203, 1997.

HARMON, Karen M. et al. Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States. **Genome announcements**, v. 3, n. 6, p. e01315-15, 2015.

LADEKJAER-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; STORGAARD, T.; KRAKOWKA, S.; ELLIS, J.; MCNEILLY, F.; ALLAN, G.; BOTNER, A. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and nonimmunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary Microbiology**, v.89, p.97-114, 2002.

LIU, Xing et al. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from China with high homology to PCV2c. **Archives of Virology**, v. 161, n. 6, p. 1591-1599, 2016.

MARTIN, Hélène; LE POTIER, Marie-Frédérique; MARIS, Pierre. Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 3, p. 388-393, 2008.

MATHAY, Conny et al. Method validation for extraction of nucleic acids from peripheral whole blood. **Biopreservation and Biobanking**, v. 14, n. 6, p. 520-529, 2016.

NAUWYNCK, H. J. et al. Cell tropism and entry of porcine circovirus 2. **Virus research**, v. 164, n. 1-2, p. 43-45, 2012.

OBERACKER, Phil et al. Bio-On-Magnetic-Beads (BOMB): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. **PLoS biology**, v. 17, n. 1, p. e3000107, 2019.

O'DEA, Mark A. et al. Thermal stability of porcine circovirus type 2 in cell culture. **Journal of Virological Methods**, v. 147, n. 1, p. 61-66, 2008.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Porcine circoviruses: current status, knowledge gaps and challenges. **Virus research**, v. 286, p. 198044, 2020.

OPRIESSNIG, Tanja et al. Mutant USA strain of porcine circovirus type 2 (mPCV2) exhibits similar virulence to the classical PCV2a and PCV2b strains in caesarean-derived, colostrum-deprived pigs. **The Journal of general virology**, v. 95, n. Pt 11, p. 2495, 2014a.

OPRIESSNIG, Tanja et al. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 US variant mPCV2b strain. **Vaccine**, v. 32, n. 2, p. 230-237, 2014b.

OPRIESSNIG, Tanja et al. A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 487-494, 2013.

OPRIESSNIG, T.; MENG, X.J.; HABUR, P. G. Porcine Circovirus Type 2–Associated Disease: Update on Current Terminology, Clinical Manifestations, Pathogenesis, Diagnosis, and Intervention Strategies’, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, p.591–615, 2007.

PALLARES, F. J. et al. Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 6, p. 515-519, 2002.

PARK, Kee Hwan et al. Evaluation of a porcine circovirus type 2a (PCV2a) vaccine efficacy against experimental PCV2a, PCV2b, and PCV2d challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 87-92, 2019.

PATTERSON, A. R.; OPRIESSNIG, T. Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 217-234, 2010.

PSIFIDI, Androniki et al. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. **PloS one**, v. 10, n. 1, p. e0115960, 2015.

POSSEBON, F. S. et al. A fast and cheap in-house magnetic bead RNA extraction method for COVID-19 diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v. 300, p. 114414, 2022.

QUY, Dao Van et al. Synthesis of silica-coated magnetic nanoparticles and application in the detection of pathogenic viruses. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.

ROSARIO, K.; BREITBART, M.; HARRACH, B.; SEGALÉS, J.; DELWART, E.; BIAGINI, P.; VARSANI, A. Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. **Arch Virol.**, v.162, p.1447–1463, 2017.

ROSE, N. et al. A commercial PCV2a-based vaccine significantly reduces PCV2b transmission in experimental conditions. **Vaccine**, v. 34, n. 33, p. 3738-3745, 2016.

ROSE, N.; OPRIESSNIG, T.; GRASLAND, B.; JESTIN, A. Epidemiology and transmission of porcine circovirus 2 (PCV2). **Virus Research**, v.164, p.78-89, 2012.

ROYER, Ryan L. et al. Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, n. 6, p. 281-284, 2001.

SAIYED, Z. M.; RAMCHAND, C. N.; TELANG, S. D. Isolation of genomic DNA using magnetic nanoparticles as a solid-phase support. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, n. 20, p. 204153, 2008.

SALONEN, Anne et al. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **Journal of microbiological methods**, v. 81, n. 2, p. 127-134, 2010.

SANT'ANA, D.S. ET AL. Aspectos gerais sobre a Circovirose suína. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 10, Ed. 157, Art. 1059, 2011.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCIENTIFIC, Thermo. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers Assessment of Nucleic Acid Purity. **Wilmington, DE: Thermo Scientific Nanodrop Products**, 2013.

SEGALÉS, Joaquim; KEKARAINEN, Tuija; CORTEY, Martí. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease?. **Veterinary microbiology**, v. 165, n. 1-2, p. 13-20, 2013.

SEGALÉS, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. **Virus Research**, v.164, p.10-19, 2012.

SEGALÉS, J.; ALLAN, G.M.; DOMINGO, M. Porcine circovirus disease. **Anim. Health Res. Rev** 6, p.119-142, 2005.

SEGALÉS, J.; DOMINGO, M. Postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, p. 109-124. 2002.

SORDEN, S. D. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). **Swine Health Prod.**, v.8, n.3, p.133-136, 2000.

SSEMADAALI, M. A.; ILHA, M.; RAMAMOORTHY, S. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control. **Research in veterinary science**, v. 103, p. 179-186, 2015.

STROHMEIER, O. et al. Automated nucleic acid extraction from whole blood, *B. subtilis*, *E. coli*, and Rift Valley fever virus on a centrifugal microfluidic LabDisk. **Rsc Advances**, v. 5, n. 41, p. 32144-32150, 2015.



TAN, Siun Chee; YIAP, Beow Chin. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

TISCHER, Ilse et al. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. **Archives of virology**, v. 91, n. 3, p. 271-276, 1986.

TISCHER, I. et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. **Nature**, v. 295, n. 5844, p. 64-66, 1982.

UGELSTAD, John et al. Preparation and biochemical and biomedical applications of new monosized polymer particles. **Polymer international**, v. 30, n. 2, p. 157-168, 1993.

VOGELSTEIN, Bert; GILLESPIE, David. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 2, p. 615-619, 1979.

WITT, Sebastian et al. Establishing a novel automated magnetic bead-based method for the extraction of DNA from a variety of forensic samples. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 5, p. 539-547, 2012.

WOODARD, D. L.; HOWARD, A. J.; DOWN, J. A. PROCESS FOR PURIFYING DNA ON HYDRATED SILICA. **L United States patent US**, v. 5342931, 1993.

WOŹNIAK, Aleksandra et al. Real-time PCR detection patterns of porcine circovirus type 2 (PCV2) in polish farms with different statuses of vaccination against PCV2. **Viruses**, v. 11, n. 12, p. 1135, 2019.

XIAO, Chao-Ting et al. PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the US during 2014–2016. **Veterinary microbiology**, v. 197, p. 72-77, 2016.

XIAO, Chao-Ting; HALBUR, Patrick G.; OPRIESSNIG, Tanja. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1830-1841, 2015.

XIAO, Chao-Ting; HALBUR, Patrick G.; OPRIESSNIG, Tanja. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States. **Journal of Virology**, v86, p. 12469, 2012.

ZANELLA, J.R.C. Situação atual da circovirose no Brasil. **Embrapa Suíno e Aves**, p.150-156, 2017.