






# ESTUDO DA CONSERVAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO COM A TECNOLOGIA FTA-Card®

Cleypson Vinicius Silveira<sup>1,2</sup>   
 Angelica Benitez<sup>2</sup>   
 Açucena Veleh Rivas<sup>1</sup>   
 Marcelo Fruehwirth<sup>1</sup>   
 Robson Michael Delai<sup>2</sup> 

SILVEIRA, C. V.; BENITEZ, A.; RIVAS, A. V.; FRUEHWIRTH, M.; DELAI, R. M. Estudo da conservação de material biológico com a tecnologia fta-card®. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, v. 24, n. 1cont., e2403, 2021.

**RESUMO:** O Whatman FTA-Card® é um papel-filtro quimicamente tratado, destinado à coleta, transporte, armazenamento de amostras para posterior extração de ácidos nucleicos. A tecnologia FTA-Card® é utilizada para manter estável DNA e RNA em temperatura ambiente, podendo ser utilizados para fixação de uma ampla variedade de material orgânico ou tecidos. Foram realizados testes para certificar sua eficiência na conservação do material a ser analisado com o intuito de eliminar a cadeia fria de conservação, agilizando o processo e diminuindo os custos da execução de exames moleculares associados ao diagnóstico de patologias. Foram testadas oito amostras de felinos na forma de sangue total e soro, para a extração utilizou-se o kit Magazorb RNA Total mini-prep kit (Promega®, EUA), para o diagnóstico foi utilizada a técnica de PCR em tempo real para amplificar o gene CI2 de mamíferos, a fim de visualizar a eficácia na conservação de ácidos nucleicos. A utilização desse método torna possível que o material biológico seja enviado por serviços de transporte postais, reduzindo os custos e viabilizando diagnósticos provenientes de áreas mais remotas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Transporte de amostra. Material Biológico. Medicina Tropical.

## STUDY ON THE CONSERVATION OF BIOLOGICAL MATERIAL WITH FTA-Card® TECHNOLOGY

**ABSTRACT:** Whatman FTA-Card® is a chemically treated filter paper intended for the collection, transport, and storage of samples for later extraction of nucleic acids. FTA-Card® technology is used to keep DNA and RNA stable at room temperature and can be used to fix a wide variety of organic material or tissues. Tests were carried out to certify its efficiency in the conservation of the material to be analyzed in order to eliminate the cold conservation chain, speeding up the process and decreasing the costs of performing molecular tests associated with the diagnosis of pathologies. By using this method, biological material can be sent by postal transport services, reducing costs and making diagnoses from more remote areas feasible. Samples of feline specimens were tested in the form of whole blood and serum, using the Magazorb RNA Total mini-prep kit (Promega®, USA) for the extraction. Diagnosis was performed using real-time PCR technique to amplify the mammalian CI2 gene in order to visualize the effectiveness in conserving nucleic acids.

**KEYWORDS:** Sample transport. Biological material. Tropical medicine.

## ESTUDIO DE CONSERVACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO CON LA TECNOLOGÍA FTA-Card®

**RESUMEN:** Whatman FTA-Card® es un papel de filtro tratado químicamente, destinado a la recogida, transporte, almacenamiento de muestras para su posterior extracción de ácidos nucleicos. La tecnología FTA-Card® se usa para mantener el ADN y el ARN estables a la temperatura ambiente y se puede usar para la fijación de una amplia variedad de materiales o tejidos orgánicos. Se realizaron pruebas para certificar su eficiencia en la conservación del material a analizar con el fin de eliminar la cadena de frío de conservación, agilizando el proceso y reduciendo los costos de realización de pruebas moleculares asociadas al diagnóstico de patologías. Se analizaron ocho muestras felinas en forma de sangre total y suero, para la extracción se utilizó el mini-prep kit Magazorb RNA Total (Promega®, USA), para el diagnóstico se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para amplificar el CI2 de mamífero gen, con el fin de visualizar la efectividad en la conservación de ácidos nucleicos. El uso de ese método permite el envío de material biológico por los servicios de transporte postal, lo que reduce los costes y permite realizar diagnósticos desde zonas más remotas.

**PALABRAS CLAVE:** Transporte de Muestras. Material Biológico. Medicina Tropical.

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v24i1cont.2021.7659>

<sup>1</sup> Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira, Foz do Iguaçu, Paraná. Autor para correspondência: vinny2ibz@gmail.com

<sup>2</sup> Centro Universitário União Dinâmica Cataratas, Foz do Iguaçu, Paraná

## Introdução

Com a crescente demanda de diagnósticos moleculares, é necessário um método de transporte fácil e seguro de amostras biológicas. O FTA-Card® apresenta-se como uma alternativa para armazenamento de curto e médio prazo para o transporte de amostras biológicas à temperatura ambiente, descartando a necessidade da cadeia fria de transporte (KATO *et al.*, 2010).

O diagnóstico molecular é uma ferramenta referência em análises qualitativas e quantitativas para as mais diversas patologias. A capacidade de quantificar a carga parasitária de doenças torna esse tipo de análise muito eficiente (QUARESMA, 2007).

O FTA-Card torna-se um método de transporte interessante para as situações onde a coleta e armazenagem de material biológico são de difícil execução (BOUE *et al.*, 2017).

Além disso, o processo possui custo inferior ao transporte tradicional em cadeia fria, e é menos complexo para extração de DNA (SANTOS *et al.*, 2010), facilitando a utilização em diferentes áreas, inclusive locais remotos, sendo um método eficiente para amostras de sangue, células e patógenos, sem o uso de qualquer solvente orgânico ou equipamento especializado (KATO *et al.*, 2010).

Quando as amostras são colocadas no FTA-Card®, as células sofrem a lise celular e os ácidos nucleicos são fixados no cartão, evitando a degradação, conservando o material fixado contra o dano oxidativo, UV, e contribuindo para a prevenção da contaminação bacteriana (KATO *et al.*, 2010; KRAUS *et al.*, 2011). Entretanto, é necessário que os cartões permaneçam secos para que se mantenha a viabilidade das amostras alocadas (KRAUS *et al.*, 2011).

## Materiais e Métodos

Foram utilizados oito cartões FTA-Card® (WHATMAN<sup>1</sup>, 2002) separados em: 100µL de soro de sangue e 100µL de sangue total provenientes de felinos (*Felis catus*). Para a extração de RNA, foi utilizado o kit Magazorb™ RNA Total mini-prep kit (Promega®, EUA) seguindo a metodologia proposta pelo fabricante.

A viabilidade das amostras extraídas foi verificada por meio da técnica rRT-PCR utilizando o equipamento QuantStudio 7 Flex™ – Applied Biosystems™ – Thermo Fisher Scientific®, para a presença do gene alvo CI2, baseado em uma sequência da subunidade ribossomal 16S, por esse gene possuir uma região extremamente conservada em mamíferos.

Para verificação da pureza do material, foi utilizado o equipamento NanoDrop One UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®).

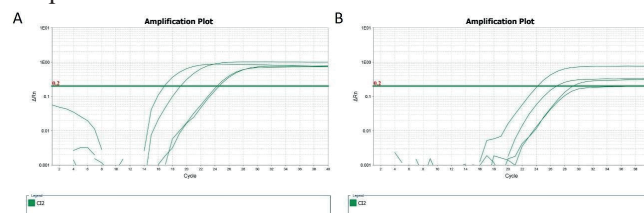
## Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados da espectrofotometria das amostras fixadas no FTA-Card®. Os resultados demonstram que o material genético possui alto nível de pureza para ser utilizado nas análises posteriores (Figura 1 e Figura 2).

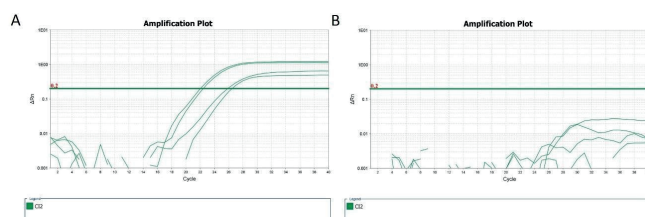
**Tabela 1:** Resultado da análise por espectrofotometria (a: 1º Semana, b: 2º Semana, c: 3º Semana, d: 4º Semana).

Temperatura		Amostra	Quantidade de RNA	260/230nm
Ambiente	Soro	1a	8.9	2,17
		2a	14.8	2,05
	Sangue total	3a	15.4	2,08
		4a	16.7	2
Ultra freezer	Soro	5a	19.2	1,95
		6a	21	1,98
	Sangue total	7a	22.8	1,99
		8a	22	1,93
Ambiente	Soro	1b	21,3	2,12
		2b	20	2
	Sangue total	3b	25,3	2,08
		4b	30,2	2,19
Ultra freezer	Soro	5b	15	1,97
		6b	18,2	2,01
	Sangue total	7b	17,7	1,96
		8b	17,4	1,99
Ambiente	Soro	1c	10,3	1,89
		2c	9,4	2
	Sangue total	3c	10,6	1,95
		4c	9,5	1,96
Ultra freezer	Soro	5c	14,4	2,01
		6c	12,5	1,93
	Sangue total	7c	15,5	1,93
		8c	14,1	1,95
Ambiente	Soro	1d	12,7	2,14
		2d	12,2	1,95
	Sangue total	3d	8,9	2,24
		4d	7,8	2,28
Ultra freezer	Soro	5d	17,2	2,23
		6d	14,9	2,01
	Sangue total	7d	15,2	1,92
		8d	18,9	2,12

**Figura 1.** Comparação da amplificação do material na primeira semana. A: amostras conservadas em temperatura de ultrafreezer -80° C; B: Amostras conservadas em temperatura ambiente.



**Figura 2.** Comparação da amplificação do material na última semana. A: amostras conservadas em temperatura de ultra-freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ ; B: Amostras conservadas em temperatura ambiente.



## Discussão

Os resultados encontrados pela espectrofotometria demonstram que o material genético está dentro da faixa de absorvância A260/A230 (Tabela 1), compreendida entre os valores de 1.8 e 2.2 para que a amostra seja considerada pura. (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2020).

Os resultados da amplificação por RT-PCR (Figura 1 e 2) demonstraram que as amostras permaneceram viáveis durante a primeira semana em ambas as temperaturas de conservação. Os cartões FTA-Card® foram desenvolvidos para simplificar a coleta, transporte, armazenamento e extração de materiais genéticos, sendo efetivo na preservação de uma variedade de amostras biológicas (KUBO *et al.*, 2006).

Os resultados na (Figura 1-B) demonstraram que é possível sua utilização dentro dos parâmetros observados em temperatura ambiente por um período máximo de sete dias. O material conservado em temperaturas abaixo de  $-80^{\circ}\text{C}$  teve a viabilidade constatada por pelo menos 30 dias (Figura 2-A), permitindo que permaneça viável e com um nível aceitável de pureza.

O cartão FTA-Card® foi desenvolvido para o transporte e armazenamento de tecidos biológicos oriundos de material biológico ou vegetal; Os spots do cartão FTA-Card são embebidos por um agente caotrópico que faz a lise celular e posterior conservação da amostra (WHATMAN<sup>2</sup>, 2021).

Segundo Crabble *et al.* (2003), a utilização da tecnologia FTA-Card® pode trazer grandes vantagens quando é necessário analisar amostras provenientes de regiões remotas e de difícil acesso.

A vantagem em relação à cadeia fria de transporte é a diminuição dos custos relacionados ao frete, nitrogênio líquido (NL<sub>2</sub>), gelo seco (CO<sub>2</sub>) e manutenção de veículos, devido ao FTA-Card® possibilitar o envio de alíquotas de 100µl a 500µl utilizando os serviços de postagem.

## Conclusão

O FTA-Card® é efetivo para o transporte de amostras biológicas, com seu armazenamento à temperatura ambiente por até sete dias, e em temperatura de ultrafreezer por no mínimo 30 dias.

## Referências

BOUÉ, F. *et al.* Use of FTA® card methodology for sampling and molecular characterization of *Echinococcus*

*granulosus sensu lato* in Africa. **Experimental Parasitology**, v. 173, p. 29-33, 2017.

CRABBLE, M. J. A novel method for the transport and analysis of genetic material from polyps and zooxanthellae of scleractinian corals. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 57, p. 171-176, 2003.

FUJITA, Y.; KUBO, S. I. Application of FTA-Card® technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. **Legal Medicine**, v. 8, p. 43-47, 2006.

KATO, H. *et al.* Use of FTA-Card for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 3661-3665, 2010.

KRAUS, R. H. S. *et al.* Avian Influenza surveillance with FTA-Card: field methods, biosafety, and transportation issues solved. **Journal of Visualized Experiments**, v. 54, e2832, p. 1-6, 2011.

QUARESMA, Patrícia Flávia. **Diagnóstico molecular da leishmaniose visceral canina e quantificação da carga parasitária através da reação em cadeia da polimerase**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2007.

SANTOS, G. C. *et al.* Detection of EGFR and KRAS mutations in fine-needle aspirates stored on Whatman FTA cards. **Cancer Citopathology**, v. 118, n. 6, p. 450-456, 2010.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **NanoDrop Micro-UV/Vis spectrophotometer**. NanoDrop one user guide 269-309102. July, 2020.

WHATMAN<sup>1</sup>. **FTA-Card® protocol: collect, transport and access nucleic acids – all at room temperature**. WB120047. v. 1, 2002.

WHATMAN<sup>2</sup>. **Reliable extraction of DNA from Whatman™ FTA™ cards**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/whatman-reliable-extraction-of-dna.html>. Acesso em: 28 abr. 2021.

Recebido em: 25/05/2020

Aceito em: 29/05/2021