

ESTUDO DE CASO¹: Biossegurança na manipulação do Vírus do Nilo Ocidental

O CASO

O vírus do Nilo Ocidental (WNV) é um flavivírus neurotrópico que surgiu mundialmente como uma importante causa de encefalite viral. WNV é mantido em um ciclo enzoótico entre mosquitos e aves, mas também pode infectar e causar doença em cavalos e outros animais vertebrados. A infecção de seres humanos está associada a uma doença febril que pode evoluir para uma encefalite fatal com sintomas que incluem alterações cognitivas e paralisia flácida.

Como Diretor de Biossegurança de uma empresa farmacêutica, você foi requisitado para fazer uma revisão de uma proposta de pesquisa para examinar a patogênese molecular da infecção causada pelo vírus do Nilo Ocidental. Os objetivos da proposta são: (1) desenvolver um modelo *in vitro* da infecção pelo Vírus do Nilo Ocidental em células neuronais murino, (2) aperfeiçoar um modelo de infecção em camundongos em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, e (3) testar candidatos a agentes antivirais quanto à sua capacidade de limitar a infecção viral *in vitro* e *in vivo*.

Os aspectos técnicos da abordagem experimental incluídos na presente proposta envolvem a utilização de vetores para expressão em mamíferos, para expressar genes que codificam proteínas virais.

Questão A:

Descreva o nível de biossegurança e as precauções necessárias para os aspectos *in vitro* da proposta, incluindo o uso de EPI's, controles de engenharia e descarte das culturas de células infectadas com vírus. Que cuidados adicionais teriam que ser considerados no caso de se administrar antivirais às culturas de células infectadas?

Questão B:

Descrever o nível de biossegurança animal e as precauções necessárias para os aspectos *in vivo* desta proposta, incluindo o uso EPI's, controles de engenharia, criação de animais e descarte de cadáveres e do material das gaiolas. Que aspectos desta parte da proposta apresenta maior risco para o pesquisador? E o maior risco para a equipe que cuida dos animais? Como a gestão dos animais infectados imunocompetentes difere da dos animais imunodeprimidos? Que cuidados adicionais teriam que ser considerados no caso de se administrar antivirais aos animais infectados?

Questão C:

Dado que sua empresa obteve um financiamento público para este projeto, reveja as orientações dos órgãos governamentais competentes para as pesquisas que envolvem moléculas de DNA recombinante e descreva se este protocolo requer revisão da CIBio, fazendo referência a seção correspondente das diretrizes. Descreva o nível de biossegurança e precauções necessárias para o uso de *E. coli* DH5 α transformada com um plasmídeo recombinante que expressa proteínas virais.

¹ Estudo de caso baseado no material disponível no site da *Asia Pacific Biosafety Training Network* (<http://www.apbtn.org/apbtn/trainingMaterials.html>).

DISCUSSÃO

Questão A

Vírus do Nilo Ocidental é atualmente classificado como um patógeno do grupo de risco 3 e devem ser geridos em Nível de Biossegurança 3 (NB-3). As rotas primárias de infecção incluem injeção percutânea ou exposição direta às mucosas; transmissão por aerossol não é documentada.

Os investigadores envolvidos neste projecto usam jalecos, luvas e óculos de protecção, com máscaras (por oposição aos respiradores) como uma opção para as actividades susceptíveis de produzir respingos. Todas as manipulações de culturas de células infectadas por vírus e das populações virais são realizadas em uma câmara de segurança biológica. Resíduos infectados por vírus ou contaminado são descartados por esterilização a vapor (autoclave) ou desinfecção química com cloro a uma concentração final de 10%; superfícies são desinfetados com cloro a 10%, seguido por 70% EtOH (superfícies de inox).

Uma avaliação dos dados de toxicidade relacionada com os agentes antivirais (por exemplo, MSDS, brochura IND, etc) é adequada, bem como se a disposição final destas drogas é regulada. Além disso, a consideração da volatilidade dos agentes e da sua toxicidade pode afetar o processo de esterilização devido às preocupações a respeito da liberação dos agentes durante a autoclavagem.

Questão B

Tendo em conta a avaliação do grupo de risco, os aspectos *in vivo* deste projecto é gerido em ABSL-3. As fontes prováveis de infecção em potencial incluem soro líquido, fluido céfalo-raquidiano e tecidos (especialmente neurológicos) de animais infectados. Para os experimentos com roedores, os pesquisadores usam jalecos descartáveis, revestimento de pé, protecção para os olhos, máscaras (por oposição aos respiradores, especialmente quando lidar com os animais imunocomprometidos) e luvas. Os animais são alojados em gaiolas rotuladas, equipados com capotas de filtro superior. Animais imunocomprometidos estão alojados em armários com filtro HEPA e pressão positiva. Infecções em animais são realizadas em uma câmara de segurança biológica. Camas de gaiolas de animais infectados devem ser trocadas usando uma câmara de segurança biológica modificada para funcionar como um estação de despejo de camas. Cama e carcaças de animais são esterilizados a vapor (autoclave) antes do descarte final.

Infectando os animais, presumivelmente exigindo o uso de agulhas hipodérmicas, apresenta o maior risco para os investigadores. Trocando as gaiolas, especialmente camas das gaiolas dos animais infectados, apresenta o maior risco para a equipe de cuidados de animais.

Animais imunodeprimidos apresentam dois desafios. Em primeiro lugar, sendo imunossuprimidos, a quantidade viral é susceptível de ser consideravelmente maior do que em animais imunologicamente competentes. Em segundo lugar, dado o seu status imunológico comprometido, animais imunocomprometidos devem ser protegidos da microbiota "normal" potencialmente presente no ambiente.

Deve-se considerar o destino de agentes antivirais. São esses agentes secretados ou excretados na urina ou fezes de animais tratados? São metabólitos tóxicos secretados ou excretados? Será que a cama e as carcaças devem ser geridas como resíduos regulamentados?

Questão C

As Diretrizes do NIH (National Institute of Health), Seção III-D-2-a, "Experimentos nos quais o DNA de agentes do Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 ou agentes restritos, é clonado em sistemas de vetores de procariotos ou eucariotos inferiores não patogênicos", aborda a clonagem de seqüências do vírus do Nilo Ocidental em vetores de expressão eucariotos. As precauções adequadas são BSL-2 e uso de jaleco, luvas e uma câmara de segurança biológica para manipulação de *E. coli* recombinante.

O instrutor pode querer discutir as diferentes precauções que podem ser justificados em função das proteínas virais expressas pelo vetor. Será que as proteínas fazem parte de antígenos de superfície que determinam a faixa de acolhimento? Será que as proteínas representam proteínas biologicamente ativa do vírus, que poderia aumentar a patogenicidade?

Orientações

Para a resolução das três questões reveja as normas e procedimentos dos tópicos abaixo relacionados:

Questão A	Questão B	Questão C
Princípios de Biossegurança Classificação dos microrganismos por grupo de risco Avaliação de Risco Microbiológico no Laboratório Garantias e Procedimentos de Laboratório	Avaliação de Risco Microbiológico no Laboratório Práticas de Laboratório de Manipulação de Animais	Biossegurança e laboratórios de DNA recombinante