

BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia

Prof. Armando Ventura

Apostila de Virologia

Cultivo, isolamento e quantificação dos vírus.

Cultivo de vírus animais

O cultivo de um determinado vírus animal é limitado pela necessidade de um tecido vivo em que as células possuam receptores apropriados, e que sejam suscetíveis à replicação dos vírus após a penetração no citoplasma. Inicialmente dispunha-se apenas de **animais de experimentação** em que se conseguia obter a multiplicação dos vírus, como o vírus da Raiva em coelhos. Hoje em dia essa prática persiste, sendo um exemplo importante a vigilância de arboviroses (de “artropod-born” ou veiculado por artrópodes), como os vírus da dengue e febre amarela, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, e encefalites transmitidas por outros gêneros. Nesse procedimento hemolinfa de mosquitos ou sangue de animais silvestres são inoculados em cérebro de camundongos neonatos, e estes ficam em observação para ver se ocorre o aparecimento de sintomas de paralisia, o que é indicativo da presença de um arbovírus. Uma alternativa é a inoculação desses fluidos nas cavidades (ex.: alantóide) de **ovos embrionados (Fig1)**, cujo epitélio ou eventualmente o próprio tecido embrionário seja suscetível à infecção por determinados vírus. Podemos citar como exemplos, os vírus do Sarampo, Influenza, Polio e Herpes que crescem bem nessas células.

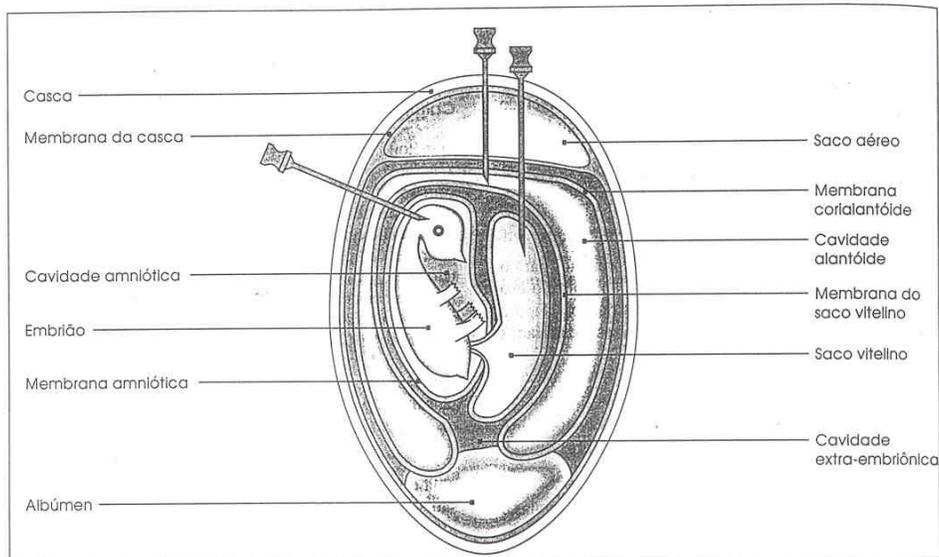


Fig. 1

O estudo dos vírus animais teve um grande avanço a partir dos anos 40, quando as **culturas celulares** passaram a ser utilizadas. Essa metodologia foi aperfeiçoada por Enders e colaboradores, para a obtenção dos vírus da poliomielite em larga escala, e formulação de vacinas.

As células podem ser obtidas a partir de **culturas de explante**. Essa técnica consiste na utilização de fragmentos de tecidos ou órgãos, que são cultivados em meio adequado de crescimento celular. Os fragmentos aderidos à superfície de um frasco apropriado vão liberar espontaneamente as células, de maneira a formar uma camada monocelular. Essas **culturas de células em monocamada** podem também ser preparadas pelo tratamento do tecido original, ou da linhagem estabelecida já cultivada em frascos, com agentes dispersantes tais como: enzimas proteolíticas (ex.: tripsina) e/ou substâncias quelantes (ex.: EDTA). Assim, com a retirada das proteínas, do cálcio e do magnésio, necessários para a ligação na estrutura do tecido ou à superfície de cultivo (plástico ou vidro), as células são dispersas. Depois desse procedimento é feito cultivo em meio nutritivo, sendo que após algumas horas de incubação as células aderem-se à superfície do novo frasco, e multiplicam-se formando outra camada celular. No caso de uma linhagem já estabelecida, a esse procedimento é dado o nome de sub-cultivo, passagem ou repique (**Fig. 2**).

As **culturas primárias** são derivadas diretamente dos tecidos. Esse tipo de cultura celular é constituído por células diplóides (contém o mesmo número de cromossomos da espécie que deu origem à cultura). A cultura primária é geralmente mais sensível que as demais para o cultivo de vírus, e pode ser utilizada para a produção de vacinas. Entretanto, apresenta algumas desvantagens, entre elas, a maior dificuldade de obtenção, o alto custo e a possibilidade de contaminação por vírus latentes no órgão que foi utilizado. As culturas primárias quando sub-cultivadas, em geral, degeneram e morrem após a segunda ou terceira passagem.

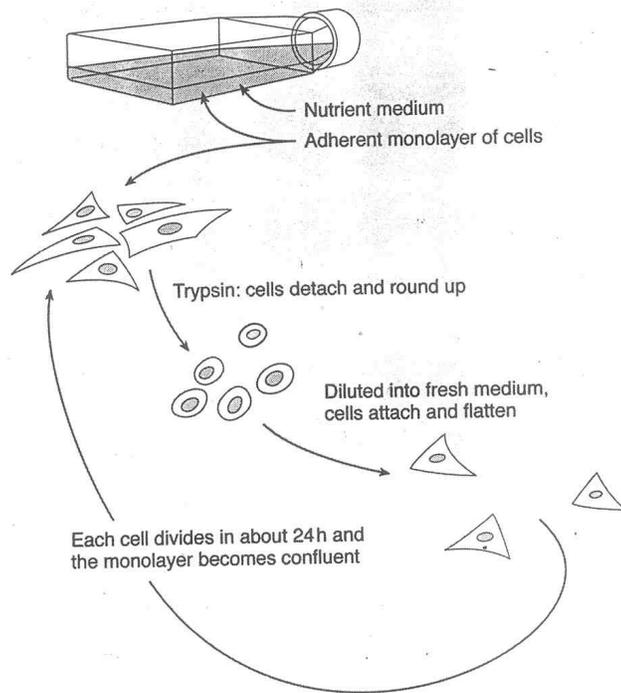


Fig. 2

No decorrer de sub-cultivos das culturas primárias, pode haver a seleção de clones, capazes de sobreviver e se multiplicar por 50 ou mais passagens (**linhagens semi-contínuas**). Esses clones podem dar origem às chamadas **linhagens celulares**, também denominadas de linhagens estabelecidas ou **contínuas**, que em geral são aneuplóides (com número de cromossomos alterado). Também são sensíveis para o isolamento de vírus e são de manutenção relativamente fácil. Os

estoques devem ser congelados em baixo número de passagens, e reativados quando necessário, mantendo assim a mesma sensibilidade à infecção. Quando a cultura de explante é feita a partir de tecido tumoral, em geral as linhagens celulares contínuas são obtidas mais rapidamente e são aneuplóides. Estas podem ser úteis para fins de diagnóstico, isolamento e propagação de vírus, produção de reagentes, mas não para produção de vacinas.

Outro método, utilizado para a obtenção de culturas celulares, baseia-se no cultivo de células em suspensão, obtidas de tecido originalmente não aderente ou adaptadas a essa condição. Neste caso, grandes populações de células podem ser obtidas, sendo úteis para o preparo de grandes volumes de vírus com altos títulos, como na produção de antígenos para confecção de vacinas ou reagentes para diagnóstico.

Isolamento de vírus de material clínico

Como vimos acima, os sistemas celulares mais utilizados para o isolamento dos vírus são: as culturas de células *in vitro*, os ovos embrionados de galinha e os animais de laboratório. A grande variedade de métodos e sistemas utilizados no isolamento de vírus de amostras de material clínico reflete o fato de que as condições ótimas de isolamento são distintas para cada vírus. Se um hospedeiro insensível é inoculado com uma amostra contendo determinado vírus, este provavelmente não será isolado, e um resultado falso negativo será obtido. As culturas celulares apresentam grande variação na sua suscetibilidade aos diferentes vírus, por exemplo, para o isolamento de poliovírus são indicadas as culturas primárias de rim de macaco ou as linhagens celulares de rim de macaco (GMK - rim de macaco verde ou LLC-MK₂ - rim de *Macaca mulata*) ou ainda linhagens celulares humanas (RD - rhabdomiosarcoma humano). Para adenovírus a linhagem indicada é a HEp-2 (carcinoma epitelial humano); para o vírus do sarampo e o vírus Herpes, a linhagem VERO (rim de macaco verde).

Quando pequenas quantidades de vírus estão presentes numa amostra, um resultado positivo só pode ser obtido quando um sistema mais sensível é utilizado. Portanto, é muito importante que o laboratório seja informado da síndrome clínica, ou do vírus suspeito, para que se possa utilizar o melhor método de detecção. Nenhuma técnica, no entanto, será eficiente, se a amostra não for colhida, transportada, armazenada e processada de forma adequada.

As amostras precisam ser colhidas na fase aguda da infecção e sua escolha deve ser apropriada: fezes, para vírus entéricos; secreção nasal para vírus respiratórios; sangue, para vírus de transmissão sanguínea, etc. As amostras, quando colhidas com "swab" (tipo de cotonete), devem ser imediatamente colocadas em solução salina tamponada ou meio de cultura, para evitar que ressequem com a conseqüente desnaturação dos vírus. De forma geral, as amostras devem ser transportadas em temperatura de geladeira para o laboratório imediatamente, para evitar a inativação dos vírus pelo calor, sendo assim conservadas até o momento do diagnóstico. As amostras, antes da inoculação em culturas celulares, ou antes, de serem usadas em qualquer teste de diagnóstico, deverão ser processadas adequadamente. Esse processamento, de modo geral, inclui fases de eluição dos vírus da amostra, com uso de salina tamponada; clarificação por centrifugação, para eliminação de resíduos indesejáveis, e descontaminação com agentes antibacterianos e/ou antifúngicos. Evita-se assim, que resíduos tóxicos ou microrganismos contaminantes interfiram no isolamento dos vírus e no diagnóstico.

Efeito citopático e quantificação dos vírus

Após a infecção, durante o processo de multiplicação intracelular, a maioria dos vírus provoca alterações na morfologia das células em cultura, denominadas de **efeito citopático (ECP)**. Algumas dessas alterações são típicas para determinados vírus, sendo que a simples observação das células ao microscópio óptico pode, além de indicar a presença, também ser útil na sua identificação. Dentre essas alterações típicas destaca-se a presença de **corpúsculos de inclusão**,

(ex.: corpúsculos eosinófilos no núcleo indicam herpesvírus). Eventualmente o efeito citopático é discreto ou não possibilita distinção entre uma gama de vírus, como por exemplo, o efeito de fusão entre membranas citoplasmáticas de células vizinhas que é provocado por diferentes vírus. À **Fig. 3** temos as células controle na parte superior da figura e células apresentando o efeito citopático de fusão abaixo. Isso leva à formação de sincícios (células grandes e multinucleadas), neste exemplo induzido pelo vírus do sarampo.

Está disponibilizado um arquivo com fotografias de células apresentando efeitos citopáticos causados por diferentes vírus, conforme discutido em aula.

Figure 1. Measles cytopathic effect (CPE) in B95a cells.
Top photo shows uninfected B95a

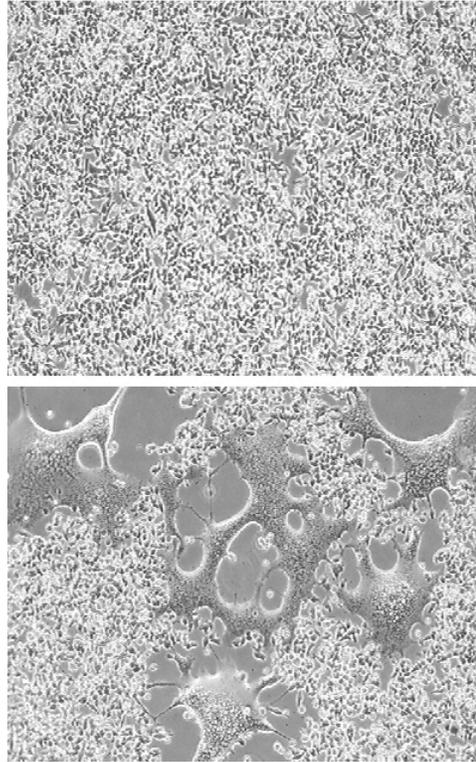
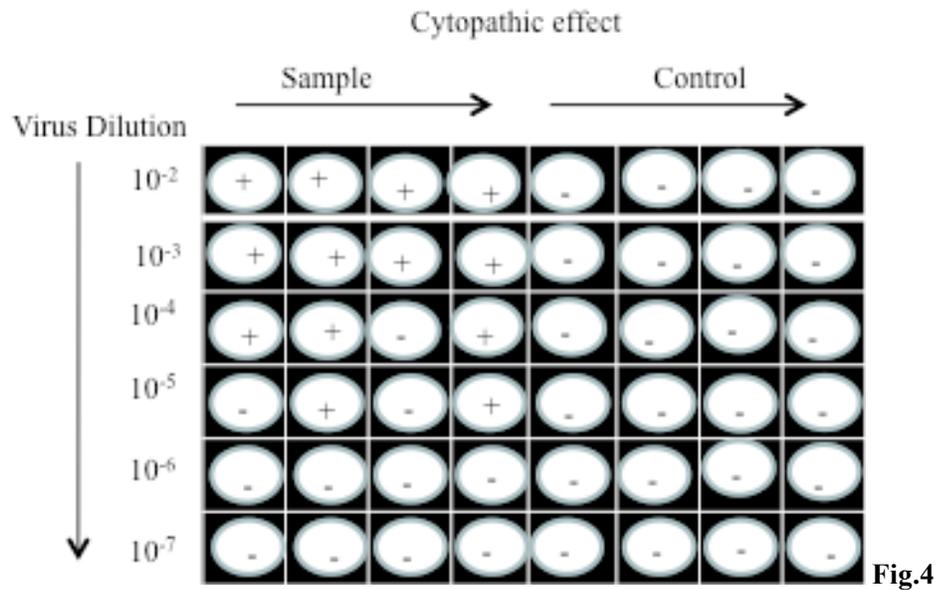


Fig. 3

O efeito citopático pode ser utilizado para montar um método de quantificação de vírus viáveis presentes numa amostra. Nesse ensaio conhecido por “**end point**”, o estoque viral é diluído sucessivamente (ex., na base dez: 1/10, 1/100, 1/1000, etc.) e depois essas diluições são depositadas sobre células numa série de compartimentos diferentes. Acompanha-se o surgimento do efeito citopático, e o título pode ser inferido pela maior diluição em que ainda é detectado o efeito citopático (**Fig. 4**).



Outro método importante para quantificar vírus, que também se vale do efeito citopático, é o **ensaio de placas de lise (Fig. 5)**. Nesse ensaio monocamadas de cultura celular também são infectadas com diferentes diluições da amostra com o vírus. O tempo de contato dos vírus com a célula deve ser o suficiente para que adiram ao receptor e penetrem, porém não pode ter início a liberação de novos vírus. Essas células são então cobertas com agarose em meio de cultivo, a uma temperatura que não as mate ($\pm 42^{\circ}\text{C}$). Depois de solidificada, a agarose impede que as partículas se difundam livremente no meio, ficando restritas às redondezas da primeira célula infectada. Se a diluição for suficientemente alta, haverá multiplicação dos vírus em pontos isolados da monocamada celular e isso pode ser visualizado, em geral pela destruição das células gerando as **placas de lise**. Na **Fig. 5**, as células saudáveis são coradas pelo vermelho neutro (um corante vital) e as células com metabolismo comprometido ficam sem coloração. O valor assim obtido pode ser convertido em **unidades formadoras de placas** (abreviada por **pfu** do inglês “plaque-forming unit”), que é reflexo do número de partículas virais viáveis que temos por unidade de volume na amostra.

Ao fazer um experimento utilizando o estoque viral quantificado, podemos utilizar um volume tal que tenhamos, por exemplo, dois vírus viáveis para cada célula, ou uma **multiplicidade de infecção** igual a dois. Essas definições são muito utilizadas em virologia.

Finalmente, deve ser frisado que o número de partículas virais presentes numa amostra sempre é superior ao número de partículas viáveis. Ou seja, a pfu será sempre menor do que a contagem por outras metodologias de quantificação física como a microscopia eletrônica. Isso ocorre porque no processo de replicação muitas partículas virais defectivas são geradas.

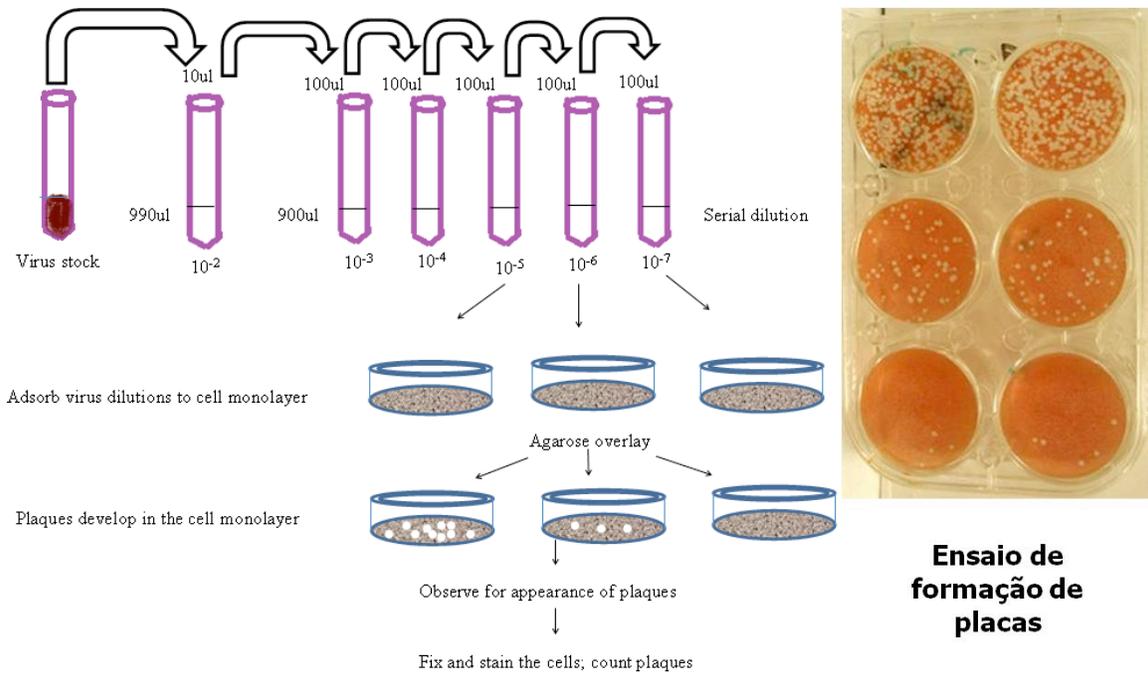


Fig. 5