

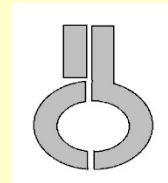
HISTÓRICO, PROPRIEDADES, CLASSIFICAÇÃO, CULTIVO E QUANTIFICAÇÃO DOS VIRUS

Integrado de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP)

para Farmácia – 0420136

Prof. Armando Ventura

**As figuras desta apresentação que têm direitos
autorais, são aqui utilizadas para ensino
sem fins lucrativos.**



HISTÓRICO E PROPRIEDADES DOS VIRUS

O que é um vírus?

**Definição construída com a evolução
do conhecimento científico e
tecnológico**

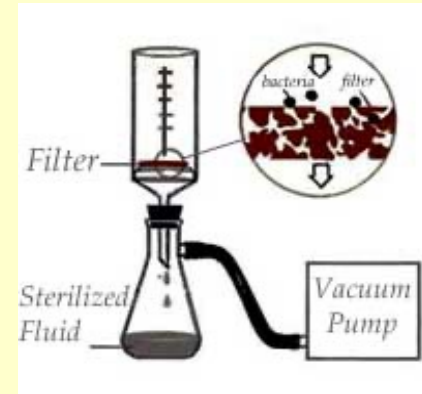
~1880: Louis Pasteur e Robert Koch consolidam a teoria microbiana das doenças

Postulados: agente patogênico presente em todos os casos; **passível de isolamento in vitro; reproduz a doença em indivíduos suscetíveis saudáveis; e destes é possível recuperar o mesmo agente**

Pasteur tentou cultivar o agente da Raiva

Não conseguiu, aí o chamou de **vírus que no latim significa veneno ou toxina**

Mosaico do Tabaco



Filtros esterilizantes

Dmitri Iwanowski 1892, mostrou que o agente que provoca o mosaico do tabaco é filtrável (extrato das folhas contaminadas filtrado provoca doença).

Martinus Beijerinck 1898, confirmou e afirmou trata-se de um germe solúvel, filtrável, associado ao protoplasma vivo das células

A técnica foi aplicada a diversos agentes patogênicos, não cultiváveis, demonstrando-se que são filtráveis:

**Doença dos pés e boca que afeta bovinos em 1898,
Loefer e Froch**

**Poliomielite humana em 1909, Landsteiner e Popper
(experimento em macacos Rhesus)**

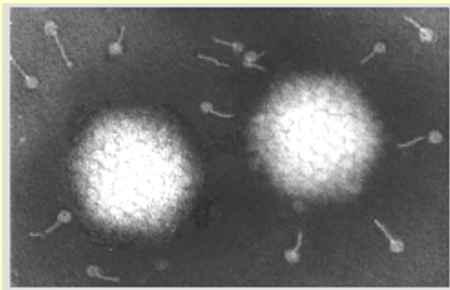
Bacteriófagos em 1915, Twort e d'Herelle

Todos são vírus!

**Invenção do microscópio eletrônico, em 1931 Ernst Ruska e Max Knoll.
Primeira visualização de um vírus foi do Mosaico do Tabaco em 1939,
Gustav Kausche, Edgar Pfankuch and Helmut Ruska.**



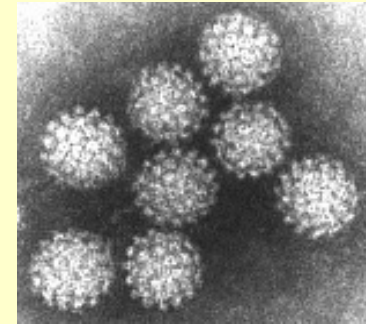
Desenvolvimento das culturas celulares possibilitou a visualização de muitos vírus humanos



Adenovírus



Vírus da Varíola



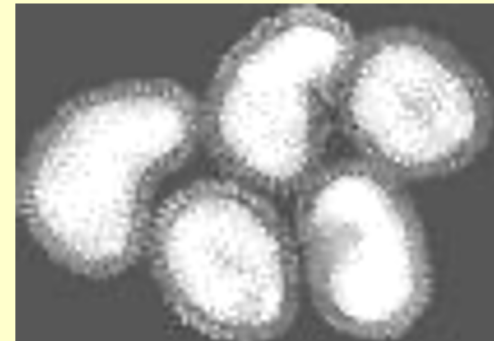
Papilomavírus



Vírus Ebola



Herpes vírus



Vírus da Influenza

Os vírus são microrganismos:

- pequenos, de 20 a 300 nm (10^{-9} m) de diâmetro
- possuem apenas um tipo de ácido nucléico
- desprovidos de estruturas celulares
 - não crescem, não metabolizam
 - não sofrem divisão
 - inertes fora de células vivas
- são parasitas intracelulares obrigatórios

Salvador Luria e James Darnell, nos dão uma definição bem concisa e completa de vírus:

“Vírus são entidades cujo genoma é composto por **DNA ou RNA, que se reproduzem dentro de células vivas e usam sua maquinaria para efetuar a síntese de partículas especializadas, os **víriões**, que contêm o genoma viral e o transferem para outras células”.**

COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Ácidos nucleicos (genoma)

DNA

- fita dupla (ds)
- fita simples (ss)
- linear
- circular

RNA

- fita dupla (ds)
- fita simples (ss)
- linear
- circular
- fita única
- segmentado

Proteínas codificadas pelo genoma viral

Estruturais

(presentes na partícula viral)

- proteção do genoma
- reconhecimento da célula

Não estruturais

(presentes na célula infectada)

- atividades enzimáticas diversas (ex.: replicação do genoma)
- regulação da expressão gênica

- **Lipídeos**
 - **provenientes das membranas celulares**
 - **compõem o envoltório ou envelope**

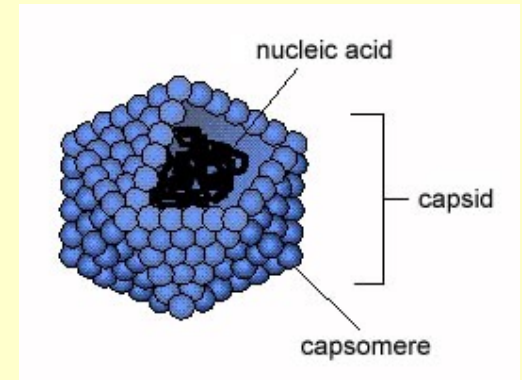
- **Açúcares**
 - **presentes nas proteínas de envoltório**
(glicosilação feita pela célula hospedeira)

ESTRUTURA

Ácido nucléico protegido pelo capsídeo viral.

Não-envelopados

- proteínas
- capsômeros
- capsídeo

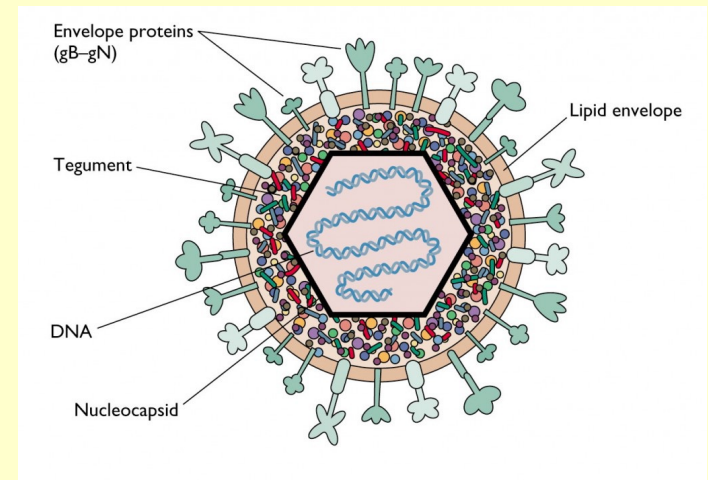


Envelopados

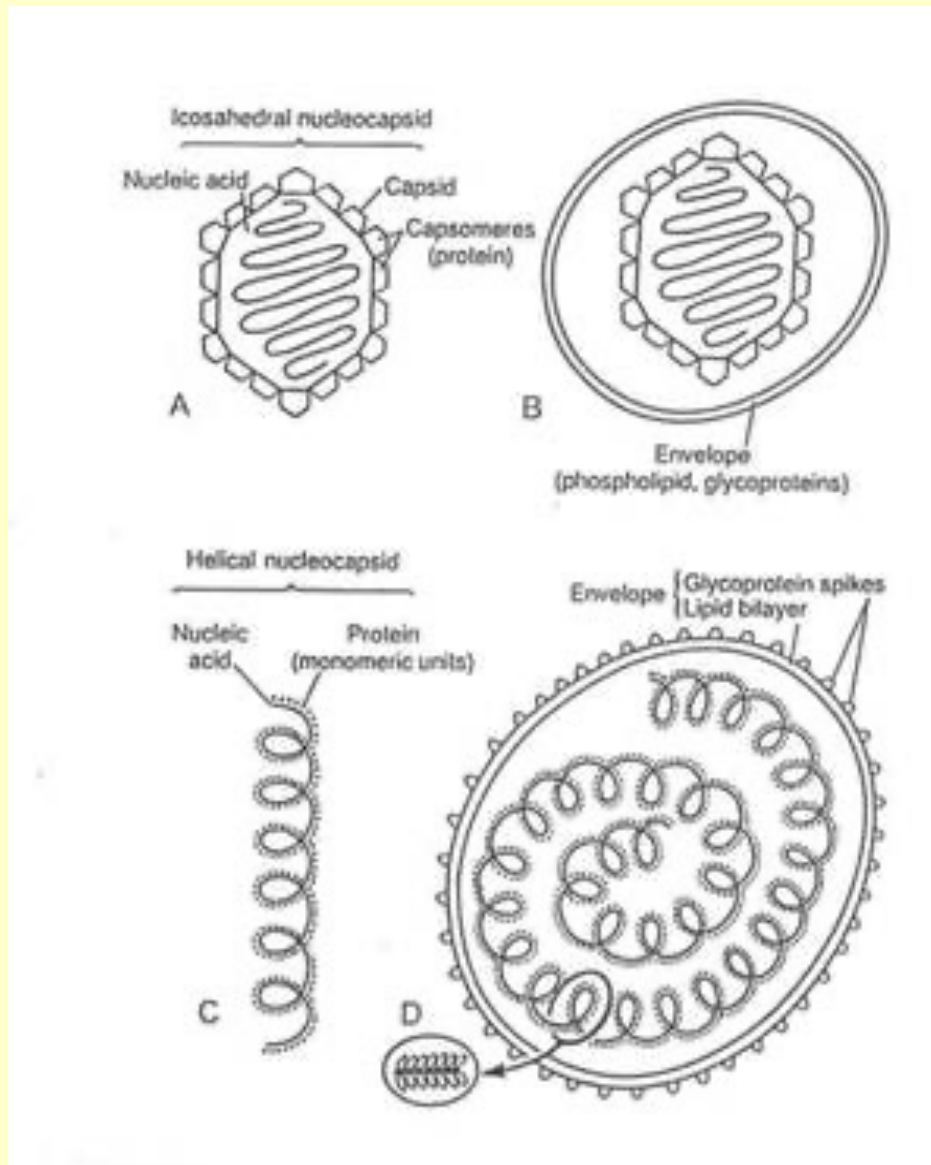
Nucleocapsídeo

Envoltório: membrana lipo-protéica

- lipídeos da célula
- proteínas virais

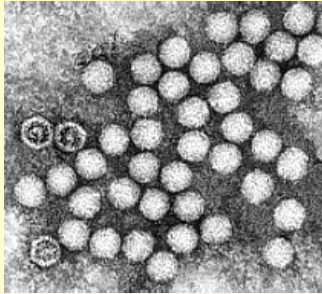


Simetria icosaédrica

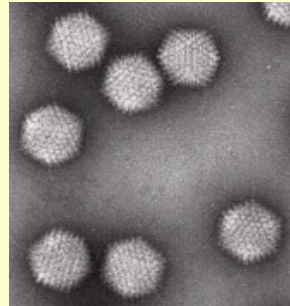


Simetria helicoidal

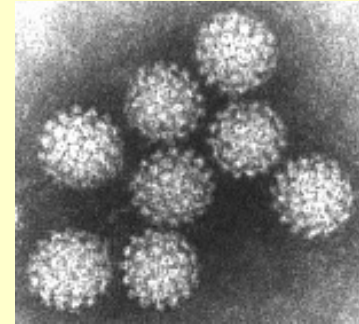
Vírus com simetria icosaédrica



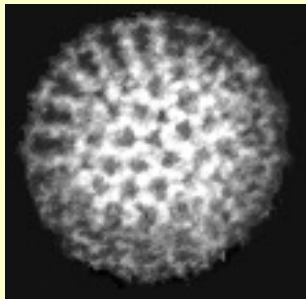
poliovírus



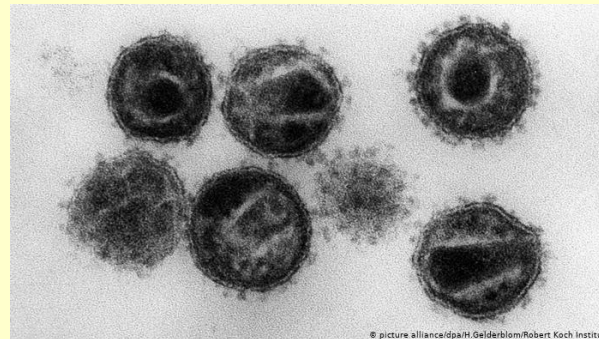
adenovírus



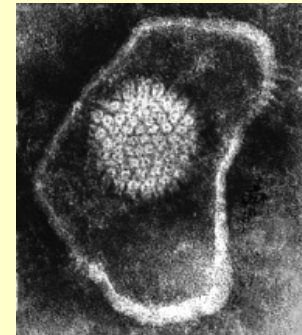
papilomavírus



rotavírus

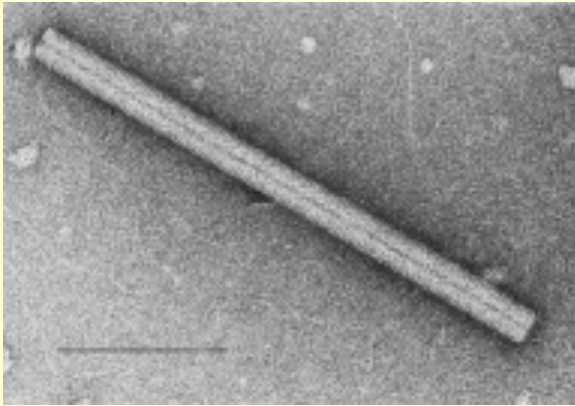


HIV

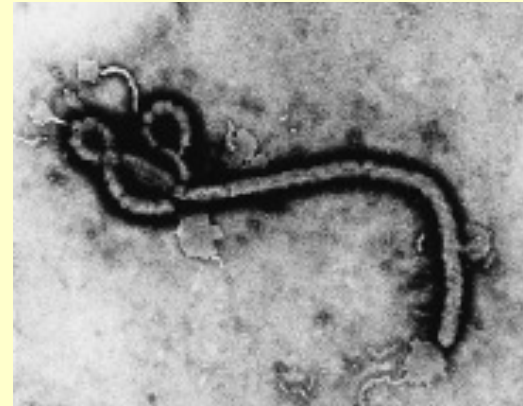


herpesvírus

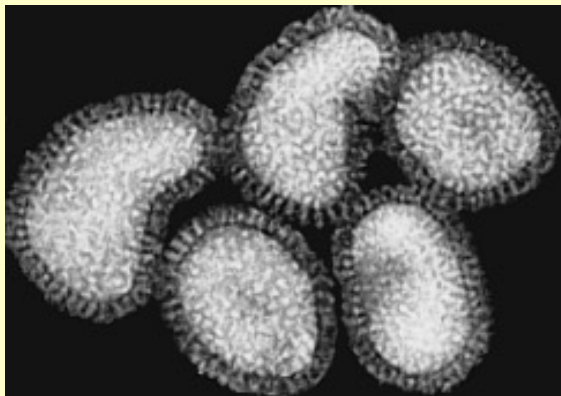
Vírus com simetria helicoidal



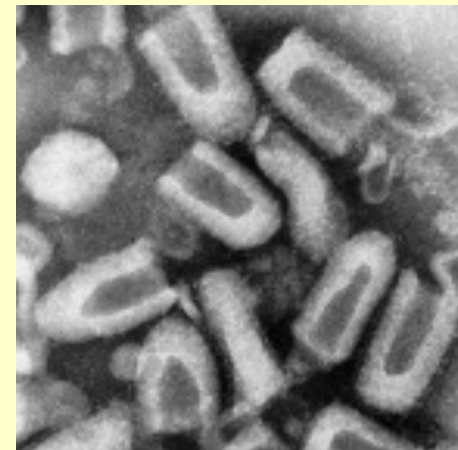
vírus do mosaico do tabaco



vírus Ebola

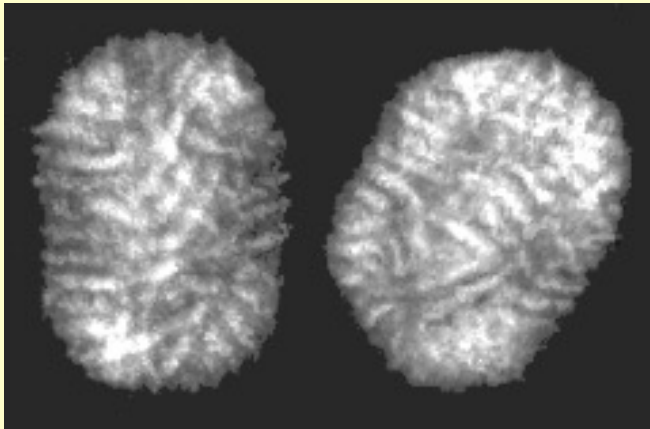


vírus influenza

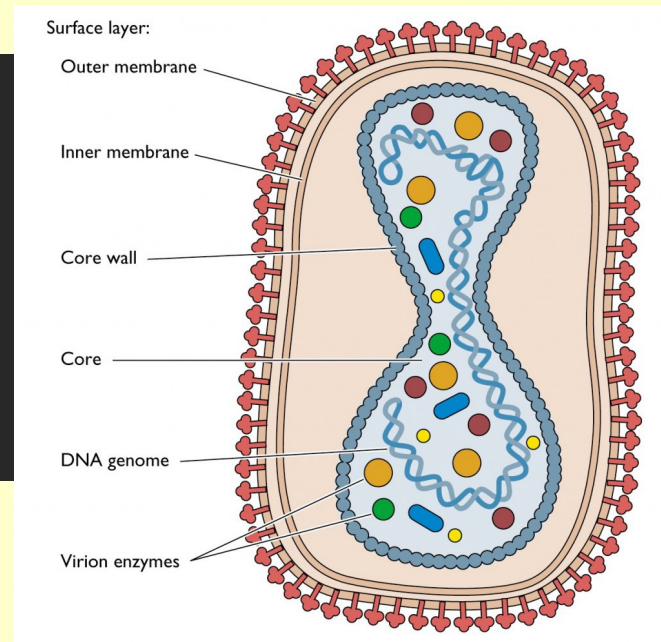


vírus da raiva

Virus de simetria complexa



Poxvirus



Guia de estudos

Porque Pasteur não conseguia cultivar agentes patogênicos posteriormente conhecidos como vírus?

Como o experimento de Iwanowski com o mosaico do tabaco contribuiu para o desenvolvimento do conceito de vírus?

Defina o que é um vírus.

Qual a composição das partículas virais?

Quais os padrões estruturais dos vírus? Descreva e dê exemplos.

CLASSIFICAÇÃO DOS VIRUS

Um critério geral que ajudou foi a organização segundo o hospedeiro:

- Vírus de vertebrados**
- Vírus de invertebrados**
- Vírus de plantas**
- Vírus de bactérias (Bacteriófagos)**
- Vírus de fungos (Micovírus)**

Critérios atuais em ordem decrescente de importância:

- Tipo de ácido nucléico e similaridade de sequencia**
- Morfologia (estrutura e simetria do capsídeo)**
- Presença de enzimas na partícula viral**
- Suscetibilidade a agentes físicos e químicos**
- Propriedades imunológicas (detecção por anticorpos)**
- Vias de transmissão (ex.: respiratória)**
- Tropismo por tecidos / hospedeiros**
- Patologia ao nível tecidual**
- Sintomatologia**

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV)

<https://talk.ictvonline.org>

Atual presidente é brasileiro:

Prof. Murilo Zerbini,

Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, MG

Está havendo uma reformulação na nomenclatura dos vírus

Year

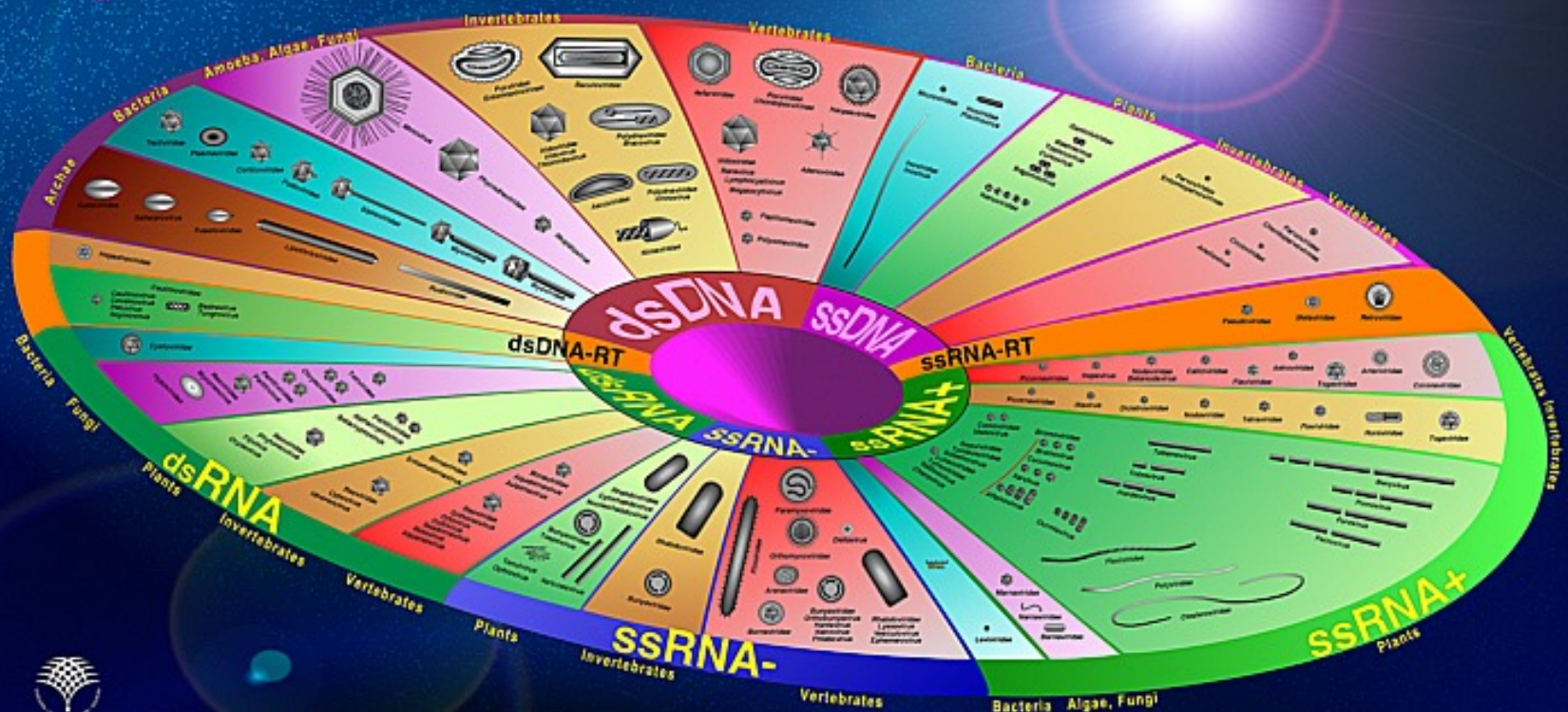
Release Info

[2020](#)

EC 52, Online meeting, October 2020;
Email ratification March 2021 (MSL #36)

6 domínios, 10 reinos, 17 filos, 2 subfilos,
39 classes, 59 ordens, 8 subordens, 189
famílias, 136 subfamílias, 2224 gêneros,
70 subgêneros, 9110 espécies

Virosphere 2005

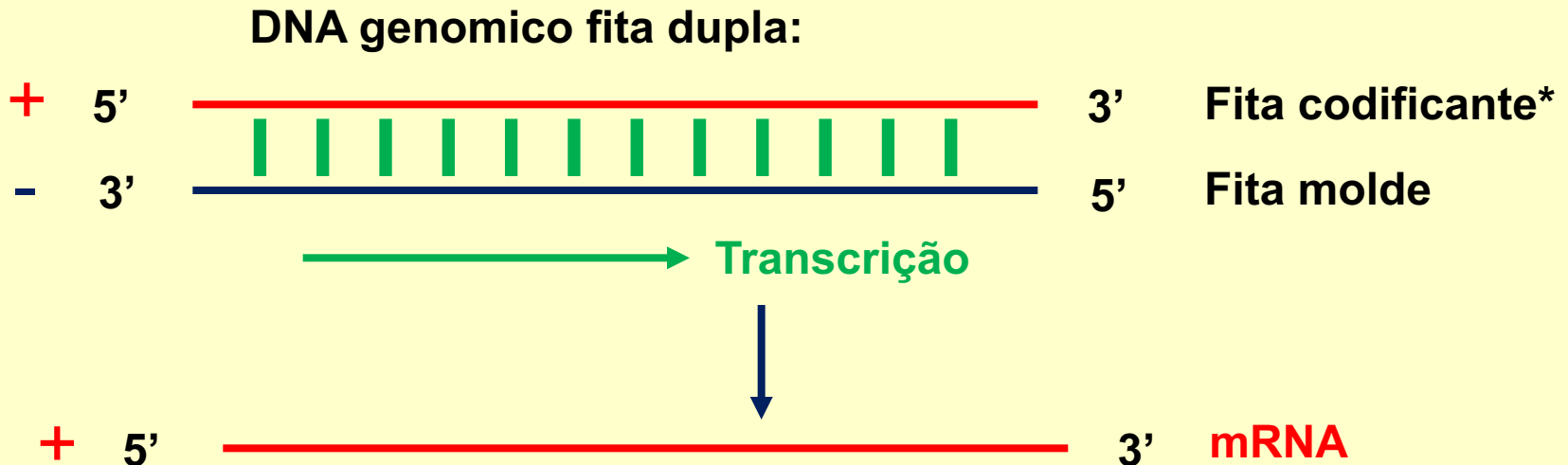


RONALD HARPETH
PLANT SCIENCE CENTER

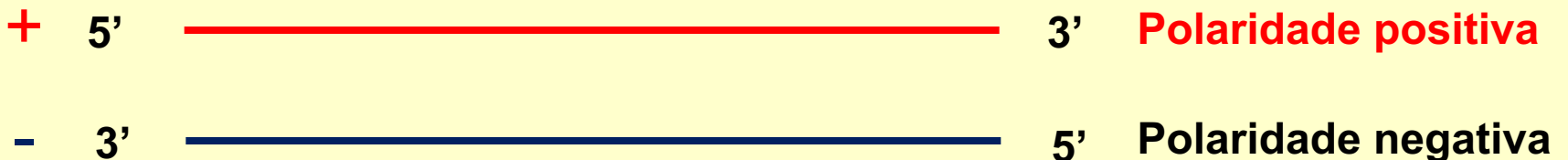
copyright©2005 C.M.Fauquet

International Committee on Taxonomy of Viruses

O que é polaridade de um genoma viral RNA fita simples?



Genomas virais RNA fita simples:



*Fitas codificantes são as que apresentam de 5' para 3' (sentido da tradução do mRNA no ribossomo) uma sequência de trincas de bases, significando uma sequência de aminoácidos no polipeptídeo (fase aberta de leitura).

DNA FITA DUPLA

FAMÍLIA	EXEMPLO	Genoma	Kpb	Envelope	Simetria
Papovaviridae	Papiloma-vírus	circular	8	Não	I
Adenoviridae	Adenovírus humanos	linear	36-38	Não	I
Herpesviridae	Herpes Simples	linear	120-230	Sim	I
Poxviridae	Varíola	linear	130-280	Sim	Complexa

FAMÍLIA	EXEMPLO	Genoma	Kpb/Kb	Envelope	Simetria
----------------	----------------	---------------	---------------	-----------------	-----------------

DNA FITA DUPLA E SIMPLES

Hepadnaviridae	Hepatite B	circular	3	Sim	I
-----------------------	-------------------	-----------------	----------	------------	----------

DNA FITA SIMPLES

Parvoviridae	Parvovirus humano B-19	(+) ou (-)	5	Não	I
---------------------	-------------------------------	-------------------	----------	------------	----------

RNA FITA DUPLA

FAMÍLIA	EXEMPLO	Genoma	Kpb	Envelope	Simetria
Reoviridae	Rotavírus	10-12 segmentos	16-17	Não	I

RNA FITA SIMPLES

FAMÍLIA	EXEMPLO	Genoma	Kb	Envelope	Simetria
Picornaviridae	Poliovírus	(+)	7.2-8.4	Não	I
Togaviridae	Rubéola	(+)	12	Sim	I
Flaviviridae	Febre Amarela	(+)	10	Sim	I
Coronaviridae	Corona-vírus	(+)	16-21	Sim	H
Rabdoviridae	Raiva	(-)	13-16	Sim	H
Paramixoviridae	Sarampo	(-)	16-20	Sim	H
Ortomixo-viridae	Influenza	(-) 8 segmentos	14	Sim	H
Buniaviridae	Hantavírus	(-) 3 seg. circulares	13-21	Sim	H
Arenaviridae	Corio-meningite linfocítica	(-) 2 segmentos circulares	10-14	Sim	H
Retroviridae	HIV	(+) 2 idênticos	3-9	Sim	I

Guia de estudos

Porque utilizar o tipo de genoma e a similaridade de sequência nucleotídica como critérios mais importantes de classificação dos vírus, comparados aos demais?

Qual a importância do ICTV para a organização do conhecimento sobre os vírus?

Explique o racional para definir a polaridade dos genomas virais de fita simples.

Escolha exemplos de vírus patogênicos para humanos, com os diferentes tipos de genoma, e comente suas características.

**Cultivo, isolamento e
quantificação dos vírus.**

Sistemas de cultivo de vírus animais

Animais de experimentação

Ovos embrionados

Culturas celulares

Animais de experimentação

Pouco utilizados para cultivo e isolamento atualmente.

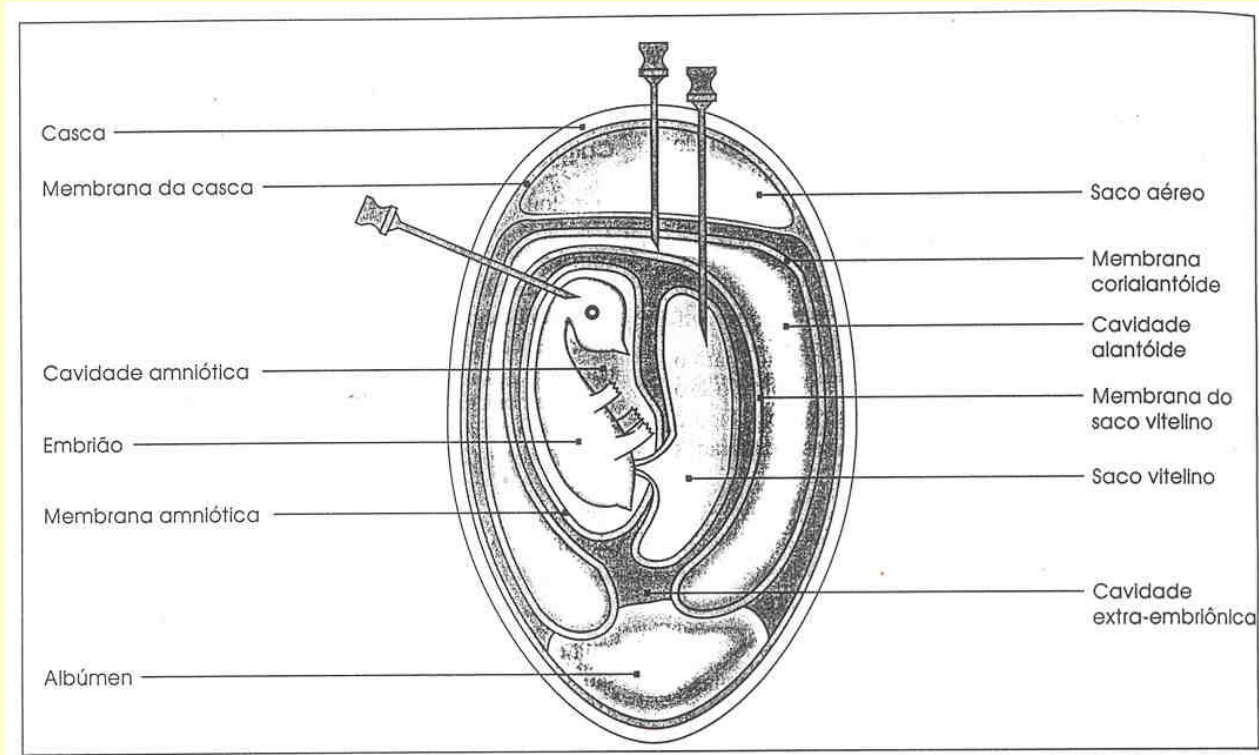
Exemplos de práticas abandonadas, cultivo de:

- vírus Vaccinia em dorso de bezerros, para imunização contra a Variola**
- vírus da Raiva em medulas de coelhos ou camundongos (também para imunização)**

Após infecção, é feito o acompanhamento de sintomas de doença ou desenvolvimento de uma lesão.

Ovos embrionados

Ainda muito utilizados para expandir vírus



Inoculação nas cavidades ou no próprio embrião.

Influenza, Sarampo, Pólio e Herpes

Observação de danos no epitélio, e outros testes para detectar vírus nos líquidos dessas cavidades (ex.: teste de hemaglutinação).

Culturas celulares

Obtenção de culturas celulares

A partir de uma biópsia (órgão, tumor, pele), faz-se a dispersão do tecido por tratamento mecânico e adição de proteases. Em meio nutritivo, contendo soro fetal bovino (para células animais), ocorre a proliferação das células.

Culturas celulares

As culturas celulares são amplamente utilizadas no isolamento viral, e podemos classificá-las genericamente em dois tipos.

Primarias

As culturas primárias são consideradas as melhores pois suportam a multiplicação de uma maior variedade de vírus, entretanto, sua obtenção é muito dispendiosa além de ser difícil contar com um suprimento confiável.

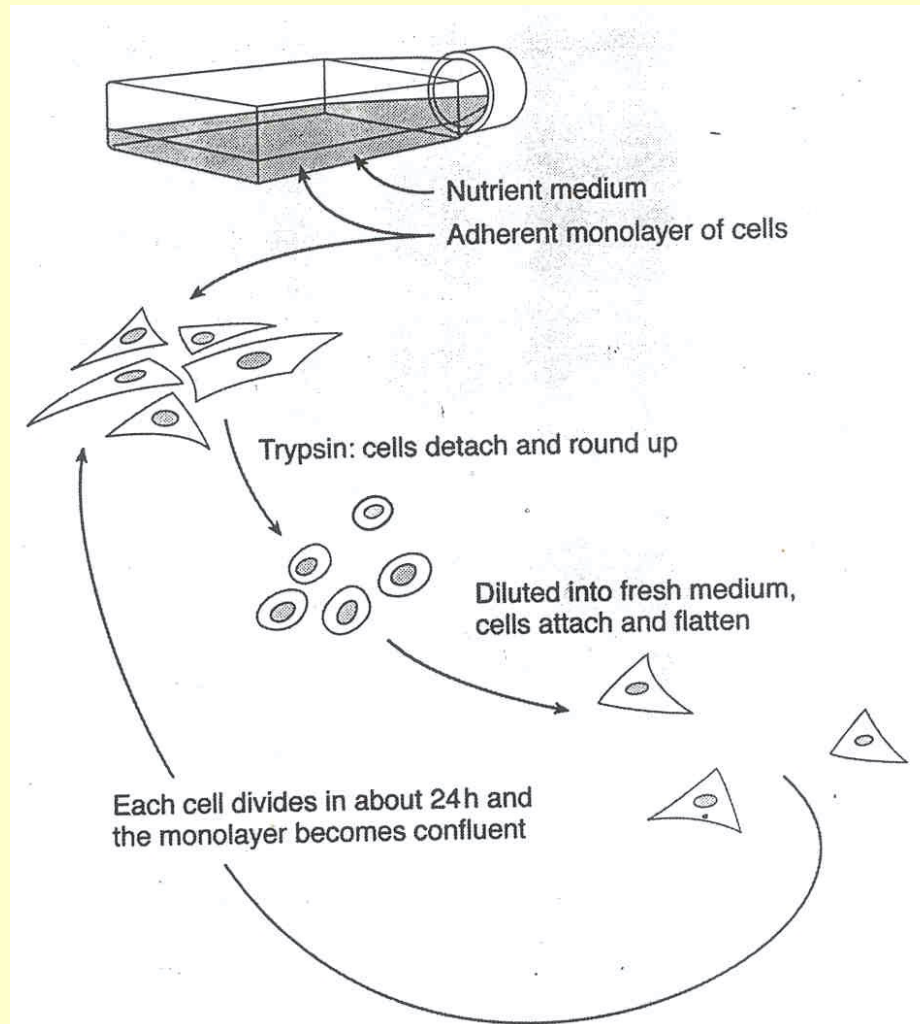
Linhagens contínuas (ex.: HeLa, Hep2)

A linhagens contínuas são as de mais fácil manipulação, porém a variedade de vírus que nelas se multiplica é mais limitada, limitação superada pela manutenção de uma coleção dessas linhagens.

Cultivo de células animais

As células podem crescer aderidas a superfícies (aderentes), ou em suspensão (não aderentes).

Esquema de expansão de uma cultura de células aderentes:



Cultivo de células animais



Garrafa de cultivo (plástico especial)

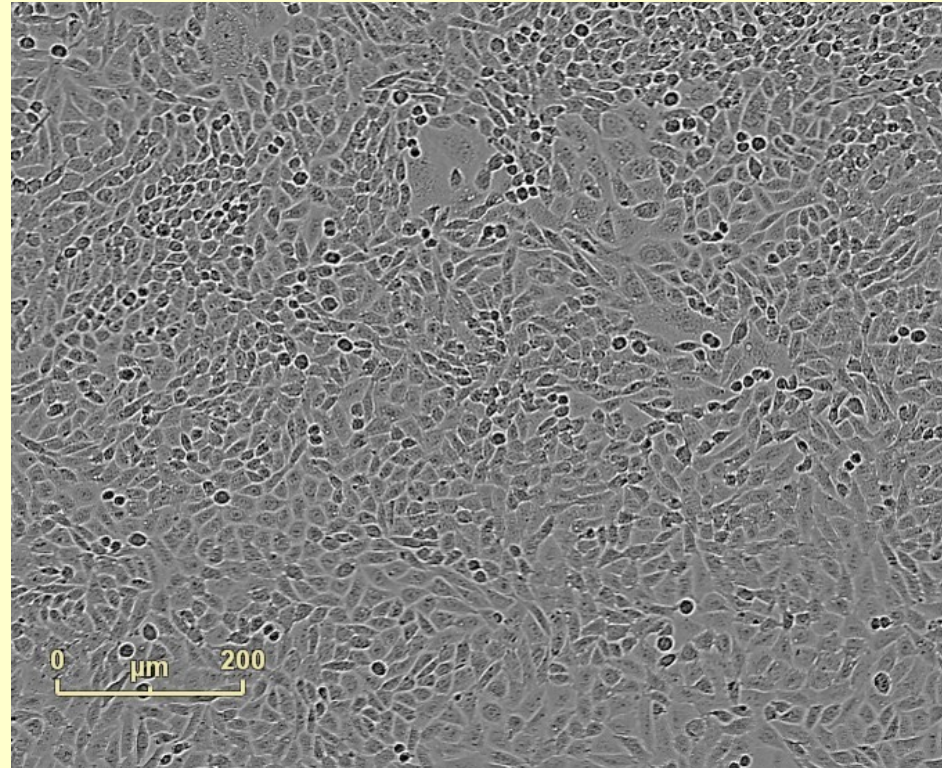


Cabine de fluxo laminar (ar livre de partículas)
Bomba de vácuo para aspirar meio de cultivo



Estufa com atmosfera de CO₂

Observação de culturas celulares com microscópio invertido.



Indicamos a seguir dois bons vídeos sobre cultura celular de fornecedores de equipamentos e reagentes (em inglês).

No link abaixo um breve histórico e embasamento teórico das técnicas de cultura celular.

<https://youtu.be/RpDke-Sadzo>

No link abaixo clique no vídeo 3: Passaging cells. É ilustrativo das técnicas de cultivo celular, e da utilização dos equipamentos e reagentes que mencionamos.

https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=video&cd=&ved=2ahUKEwj786ennvDqAhV5HLkGHU_JAksQtwlwCHoECAkQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.thermofisher.com%2Ftr%2Fen%2Fhome%2Fpreferences%2Fgibco-cell-culture-basics%2Fcell-lines%2Fadherent-vs-suspension-culture.html&usg=AOvVaw0AuuhHsUheiCc0ZqpTU3oV

Isolamento de vírus

Colheita do material clínico:

- **Espécimes apropriados dependendo da sintomatologia (swab nasal, fezes, sangue).**
- **Momento ideal da colheita, em geral durante a sintomatologia.**
- **Acondicionamento em frascos resistentes e transporte adequado, rápido e com refrigeração.**
- **Escolha da melhor linhagem celular ao chegar no laboratório, com base na sintomatologia.**

Detecção

Os vírus em crescimento podem produzir:

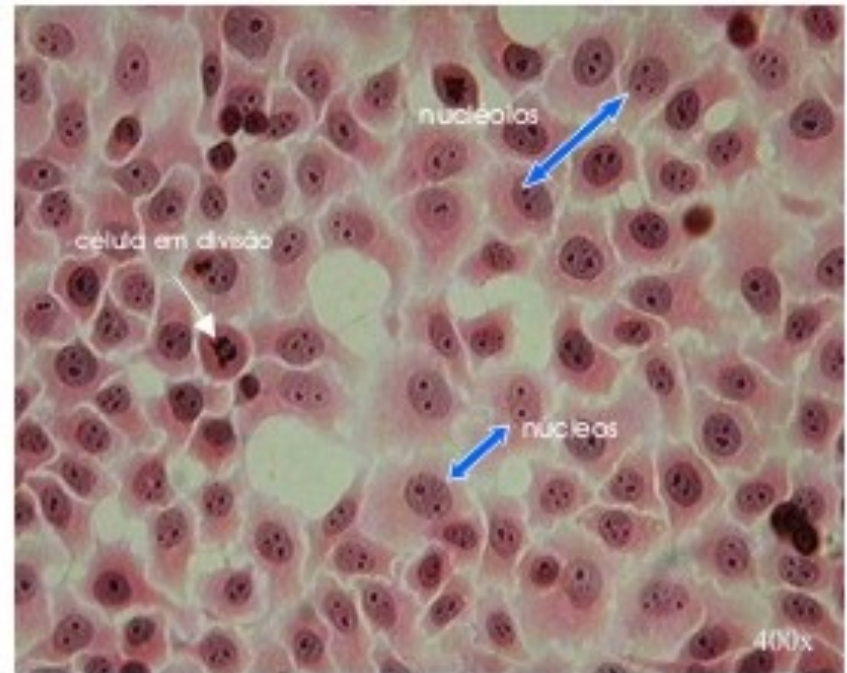
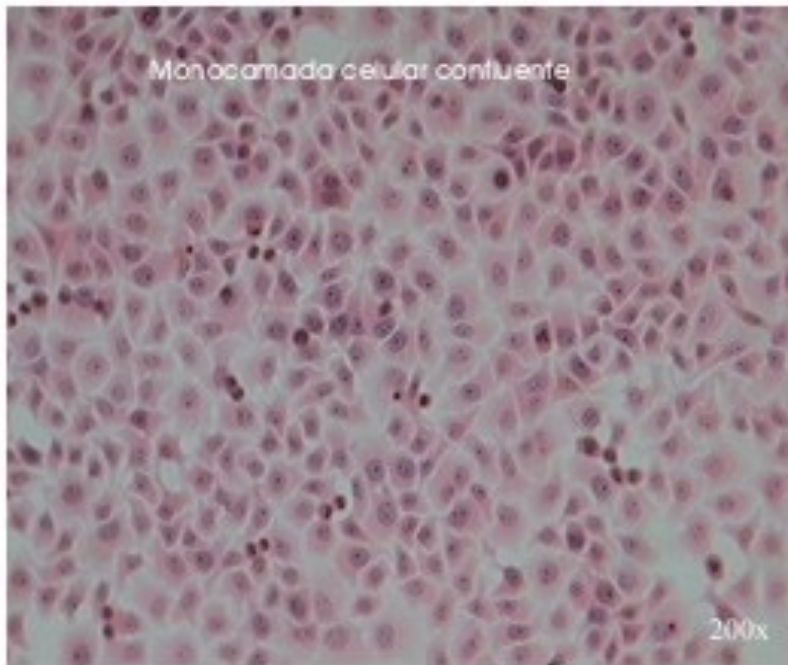
Efeitos citopáticos (ECP), como arredondamento celular, formação de sincícios, formação de corpúsculos de inclusão, que podem ser específicos ou não.

Demonstração de efeito citopático induzido por alguns vírus em células cultivadas "in vitro"

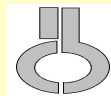
O ECP não permite a identificação do vírus, mas fornece uma base para um agrupamento preliminar deste vírus. As alterações mais detalhadas podem ser estudadas através da infecção de células em monocamada, cultivadas sobre lamínulas.

Após o aparecimento do efeito citopático, causado pela infecção com vírus, as lamínulas são fixadas, coradas através de métodos citológicos de coloração, como por exemplo o método da hematoxilina-eosina e montadas em lâminas de microscópio.

Os vírus multiplicam-se no núcleo ou no citoplasma das células, onde se agrupam formando os "corpúsculos de inclusão".

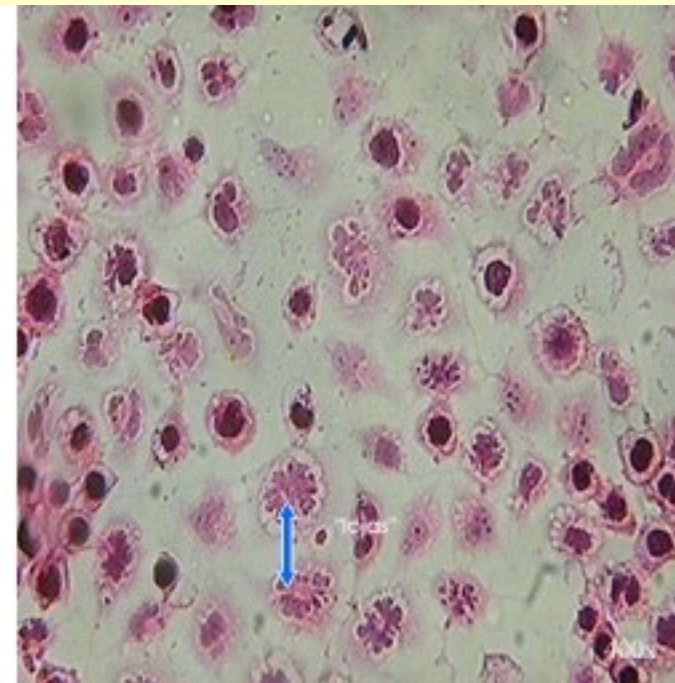
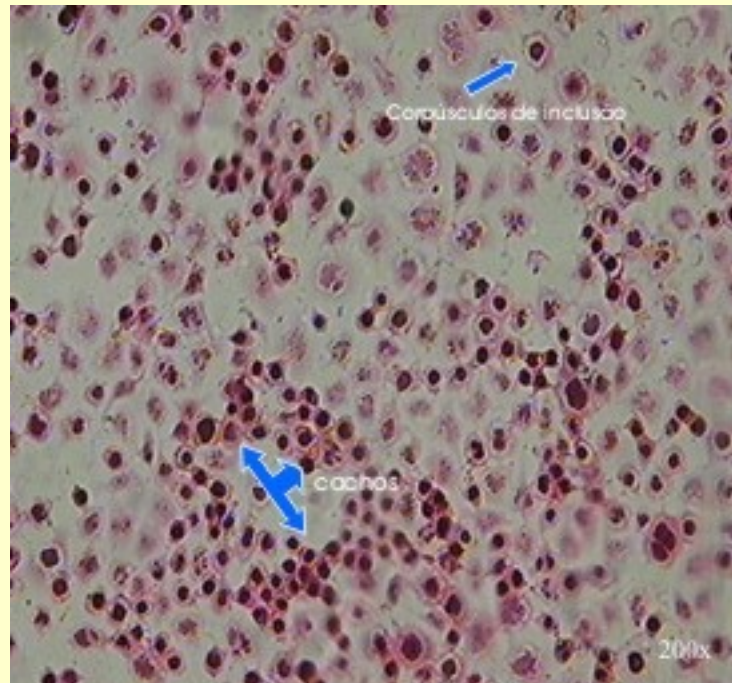


Células do tipo epitelial, de cultura **normal** formando camada monocelular contínua. Apresentam o citoplasma corado em rosa e o núcleo em roxo, com um, dois ou três nucléolos bem evidentes.

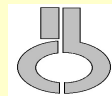


Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

Fotos de autoria de:
Telma A. Monezi e
Charlotte M Hársi

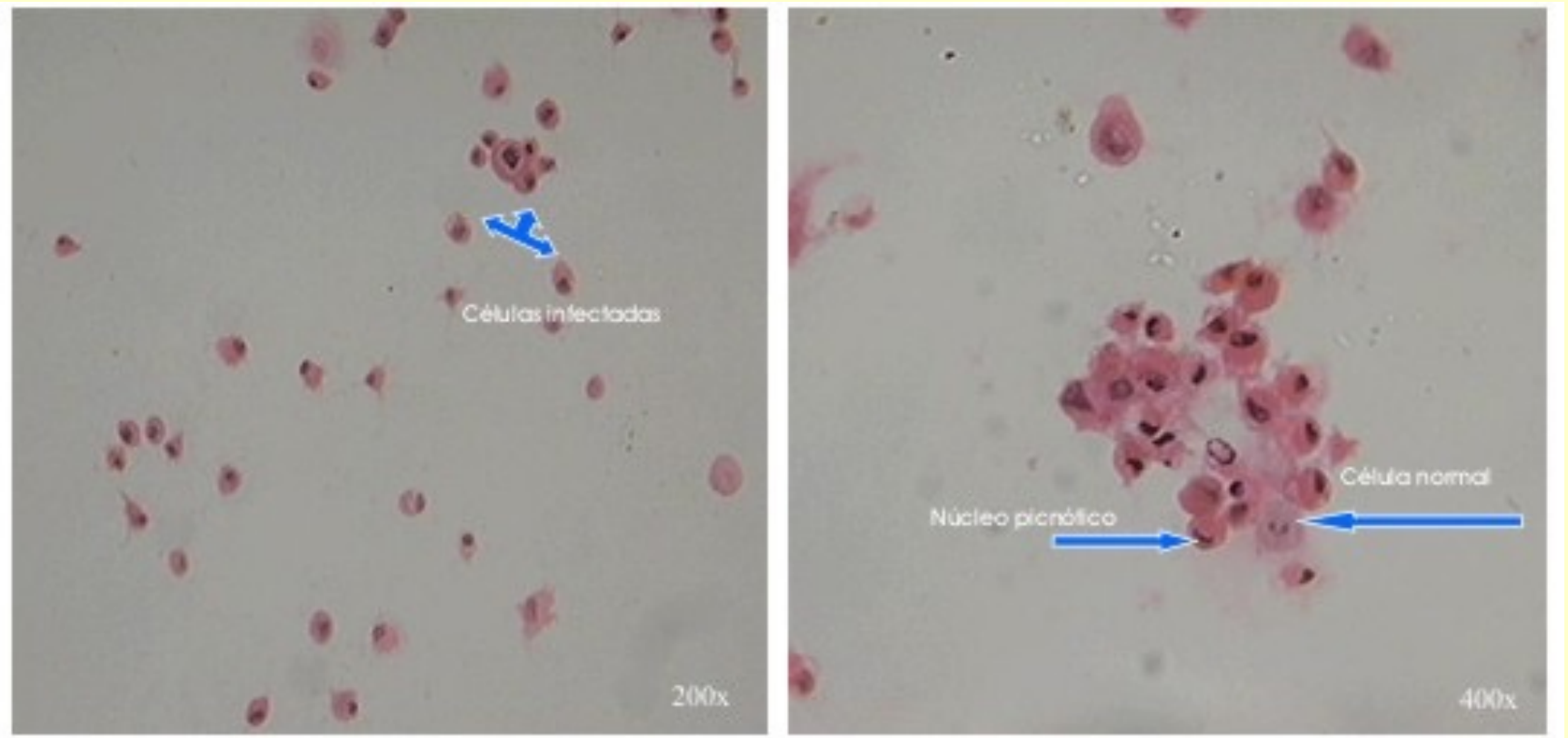


Efeito citopático produzido por **adenovírus**: as células infectadas apresentam-se grandes, arredondadas, e, às vezes, reunidas em "cachos" (no menor aumento), com alterações nucleares evidentes e características.
Corpúsculos de inclusão: eosinófilos nucleares.



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

Fotos de autoria de:
Telma A. Monezi e
Charlotte M Hársi

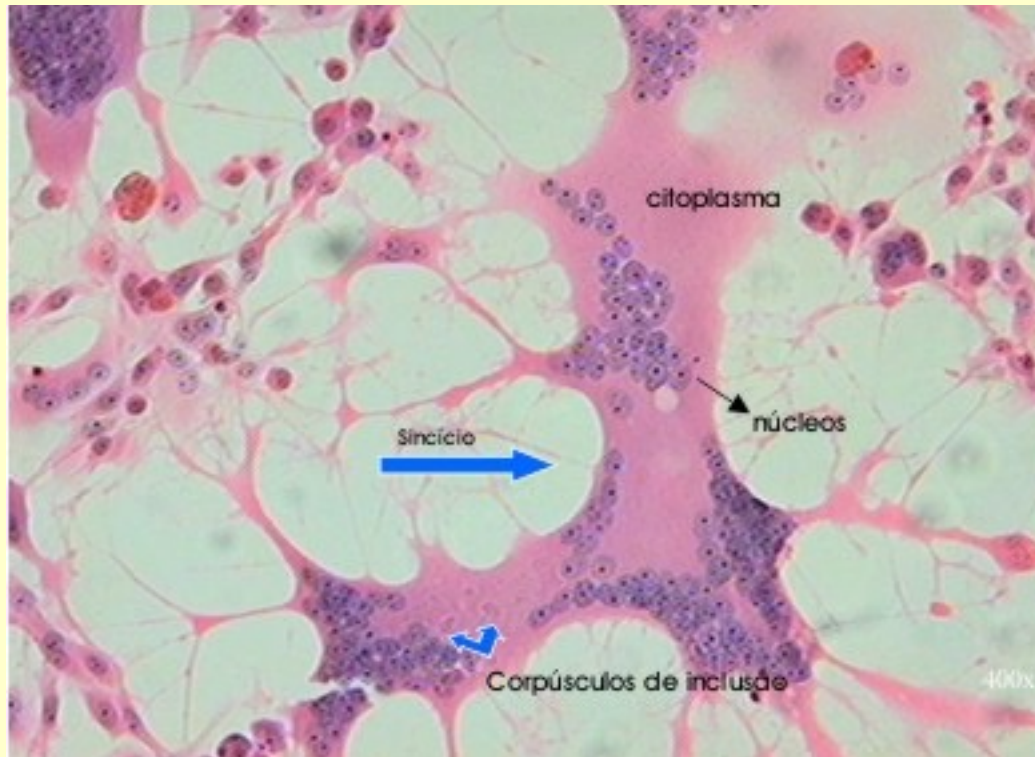


Efeito citopático produzido por **poliovírus** e outros picornavírus: as células apresentam-se pequenas, com formas irregulares, isoladas ou em grupos, com o citoplasma eosinófilo e núcleo picnótico (reduzido em volume).



Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

Fotos de autoria de:
Telma A. Monezi e
Charlotte M Hársi



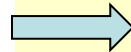
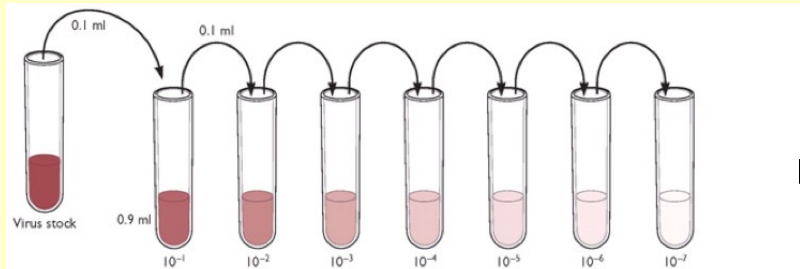
Efeito citopático produzido pelo **vírus do sarampo**: as células infectadas mostram-se multinucleadas, mas seus núcleos apresentam estruturas ainda conservadas.

Corpúsculos de inclusão: eosinófilos citoplasmáticos.



Quantificação

ECP x diluição limitante, “end point”

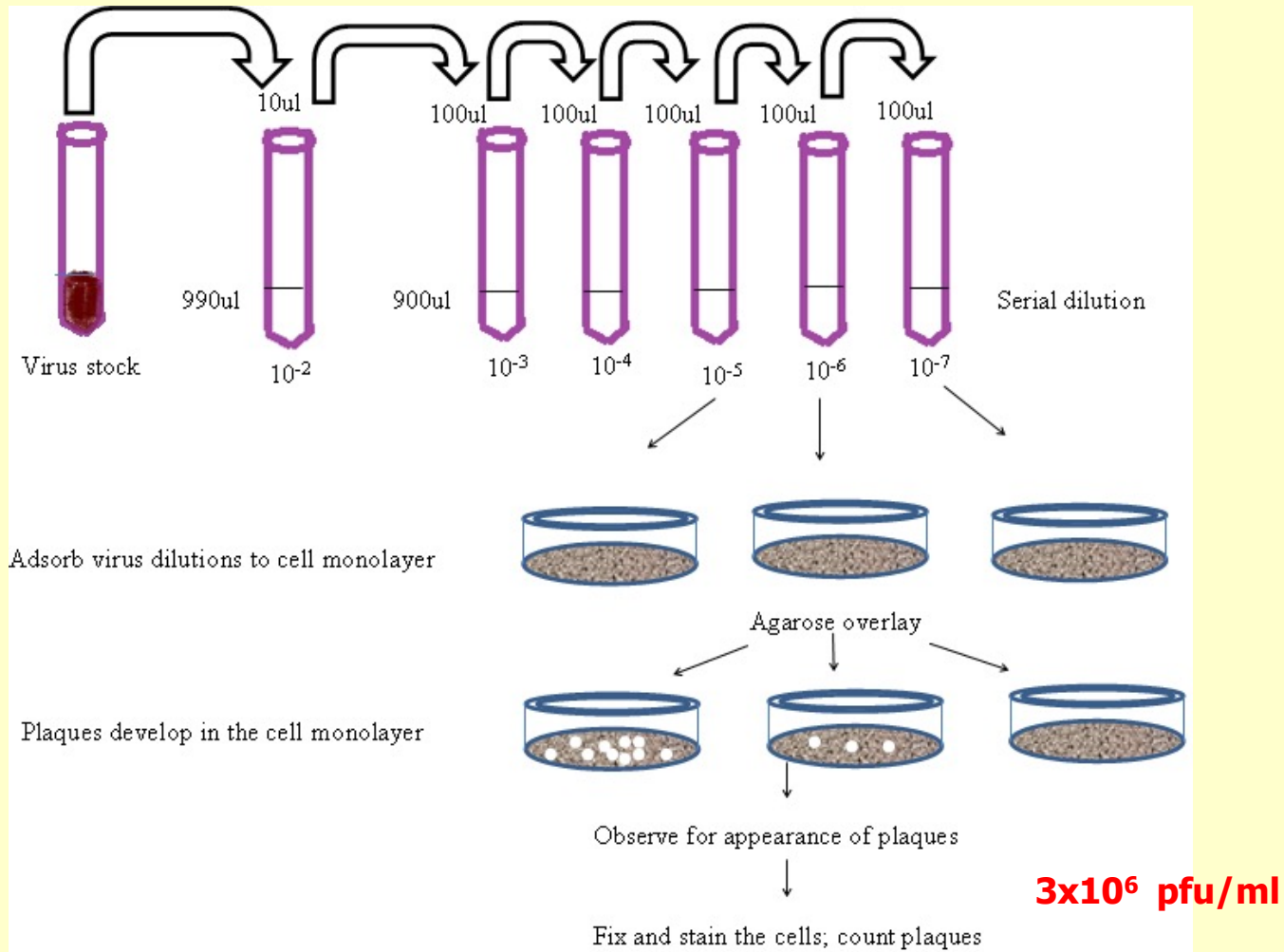


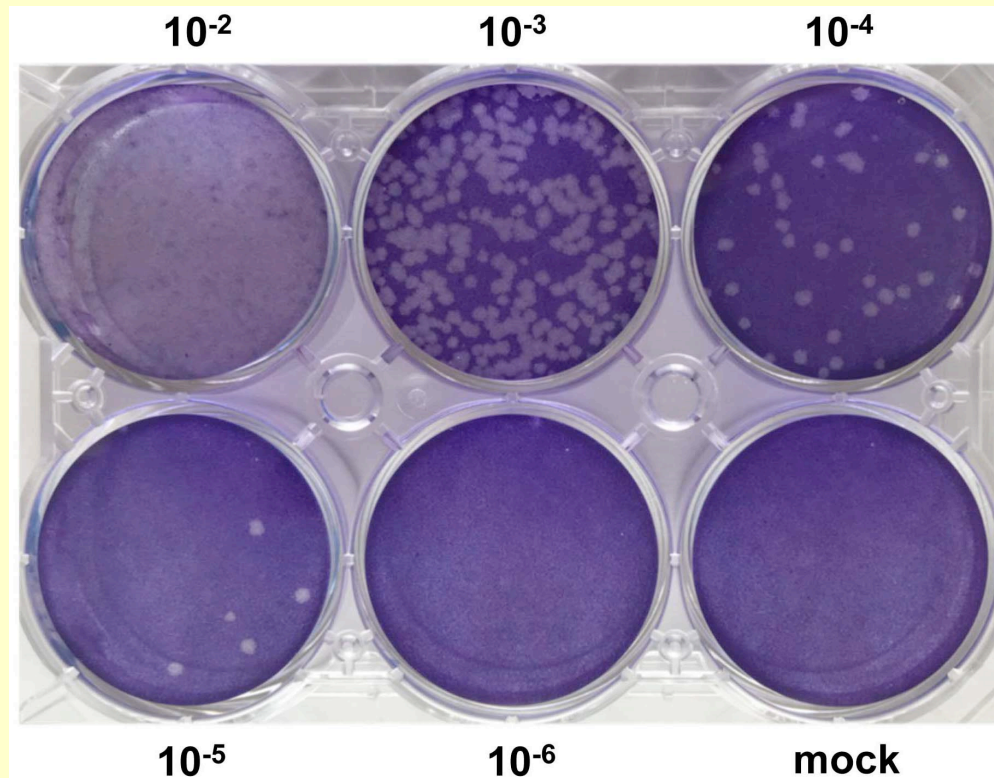
Virus dilution	Cytopathic effect									
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Metade das culturas apresenta efeito citopático na diluição 10^{-5} . Esse é o *end point*: a diluição de vírus em que 50% das culturas celulares estão infectadas. Esse número é expresso como a dose infecciosa 50% (DI_{50}) por mililitro, e o estoque viral dessa amostra contém 10^5 DI_{50} por ml.

Quantificação

Ensaio de placas de lise





5×10^5 pfu/ml

PFU permite calcular a multiplicidade de infecção MOI

Partículas virais viáveis

(número de partículas físicas é sempre maior)

Guia de estudos

Qual a importância dos diferentes sistemas de cultivo de vírus?

O cultivo de células, em particular as de mamíferos, foi um desafio que demorou a ser superado. Porque foi difícil e como esse problema foi resolvido?

Quais são as características dos diferentes tipos de cultura celular e que equipamentos são importantes para mantê-las?

Como os efeitos citopáticos observados à microscopia óptica podem nos dar informações sobre um vírus, mesmo sem lançarmos mão de técnicas moleculares?

Porque ocorre a formação de sincícios em culturas celulares infectadas por diferentes vírus?

Qual o significado dos corpúsculos de inclusão?

No ensaio de placas de lise para quantificar vírus, porque há necessidade de fazer uma cobertura de agarose sobre as células após a infecção?

Qual a utilidade de titular um estoque de vírus?