

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Orientador: Mário Celso Sperotto Brum

José Conrado dos Santos Jardim

Uruguaiana, Dezembro de 2015.

José Conrado dos Santos Jardim

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Médico Veterinário, Msc, Dr.
Mário Celso Sperotto Brum

**Uruguaiana
2015**

José Conrado dos Santos Jardim

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
apresentado ao Curso de Medicina Veterinária,
Campus Uruguaiana da Universidade Federal
do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Medicina
Veterinária.

Área de concentração: Virologia

Relatório apresentado e defendido em 7 de Dezembro de 2015.

Marcelo Dal Pozzo

Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa
Membro da Comissão

Prof. Dr. Tiago Galina Correia

Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa

Prof. Dra Débora da Cruz Payao Pellegrini

Medicina Veterinária/Universidade Federal do Pampa

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – VIROLOGIA

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), na área de virologia. O ECSMV teve orientação do professor Mário Celso Sperotto Brum e supervisão do professor Eduardo Furtado Flores. O período de estágio ocorreu entre os dias 10 de agosto de 2015 a 13 de novembro de 2015, perfazendo um total de 450 horas. O ECSMV foi realizado no Setor de Virologia, pertencente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O setor realiza diagnóstico e pesquisas das principais doenças víricas que acometem animais domésticos e de produção, presta serviços a médicos veterinários autônomos, empresas, cooperativas, e proprietários. Durante o período de estágio foram desenvolvidas técnicas de cultivo celular, detecção e quantificação de anticorpos, amplificação e quantificação de viral, reação da polimerase em cadeia, entre outras. Além disso, foi acompanhado e/ou desenvolvido projetos de pesquisas com foco no diagnóstico e prevenção de doenças. A virologia atua no diagnóstico e no controle de enfermidades, auxiliando no controle da sanidade animal e zoonoses. O monitoramento de rebanhos e a realização de um diagnóstico rápido e preciso é extremamente importante para prevenir e controlar a disseminação de doenças. O estágio proporcionou conhecer novas realidades e por permitir me dedicar exclusivamente a área de interesse, contribuindo assim para a formação pessoal e acadêmica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Local do estágio. Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria.....	7
Figura 2: Amostras encaminhadas ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria.....	22
Figura 3: Comparação entre os resultados das amostras testadas por IDGA e SN para a presença de anticorpos para o vírus da lígna azul.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Atividades de diagnóstico acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	8
Tabela 2:	Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	9
Tabela 3:	Relação de enfermidades e/ou suspeitas e as técnicas de diagnóstico disponível para diagnóstico no SV/UFSM.....	12

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
BEI	Etilenoimina binária
BEA	Etilenoamina binária
BHK-21	<i>Baby hamster kidney</i> (Células de rim de hamster neonato)
BoHV-1	<i>Bovine herpesvirus type 1</i> (Herpesvírus bovino tipo 1)
BTV	<i>Bluetongue virus</i> (Vírus da língua azul)
BVDV	<i>Bovine viral diarrhoea virus</i> (Vírus da Diarreia Viral Bovina)
CDV	<i>Canine distemper virus</i> (Vírus da Cinomose Canina)
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPV	<i>Canine parvovirus</i> (Parvovírus Canino)
CRFK	<i>Crandell feline kidney</i> (Célula de Rim Felino)
CRIB	Células resistente a infecção por BVDV
DICC50	Doses infectantes para 50% do cultivos celulares
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EAV	<i>Equine arteritis virus</i> (Vírus da arterite equina)
ECP	Efeito citopático
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Teste imunoenzimático)

EPI	Equipamento de proteção individual
FEG	Fibroblasto de embrião de galinha
H	Horas
HA	Hemaglutinação
HeLa	<i>Henrietta Lacks cells</i> (Células de linhagem humana)
ICC	Isolamento em cultivo celular
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IFA	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
kgf/cm ²	Quilograma-força por centímetro quadrado
LABLEPTO	Laboratório de Leptospirose
LADOPAR	Laboratório de Doenças Parasitárias
NCP	Não citopático
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i> (Células de rim de bovino)
ME	Microscopia eletrônica
MEM	Meio essencial mínimo
Min	Minutos
ml	Mililitro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina fosfatada tamponada)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de placa
RK-13	<i>Rabbit kidney cells</i> (Células de rim de coelho)
RNA	Ácido Ribonucléico

RPM	rotações por minuto
RPMi	Meio Roswell Park Memorial Institute
S	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i> (Vírus da encefalite de <i>Saint Louis</i>)
SN	Soroneutralização
SV	Setor de Virologia
TAE	Solução de Tris, ácido acético e EDTA
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
V	Volts
VACV	<i>Vaccinia virus</i> (Vírus da Vaccinia)
VEEV	<i>Venezuelan Equine Encephalitis virus</i> (Vírus da encefalite equina Venezuelana)
VERO	célula de rim de macaco-verde-africano.
WEEV	<i>Western Equine Encephalomyelitis virus</i> (Vírus da encefalite equina do oeste)
WNV	<i>West Nile virus</i> (Vírus do Nilo Ocidental)
YFV	<i>Yellow Fever virus</i> (Vírus da febre amarela)
MI	Microlitros

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	6
2 - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	8
2.1 Rotina laboratorial	8
2.1.1 Lavagem e esterilização.....	10
2.2 Diagnóstico	11
2.3 Cultivo celular	13
2.3.1 Células de linhagem	14
2.3.2 Cultivo Primário	14
2.3.3 Congelamento de células	15
2.3.4 Descongelamento de células.....	16
2.4 Amplificação viral	16
2.5 Quantificação viral	18
2.6 Soroneutralização	18
2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
2.8 Inativação viral	20
3 - DISCUSSÃO.....	22
3.2 Cultivo celular: células de linhagem e cultivo primário.....	23
3.3 Amplificação viral	24
3.4 Quantificação viral	25
3.5 Soroneutralização (SN)	26
3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	27
3.7 Inativação viral	28
3.8 Projetos de pesquisa desenvolvidos.....	29
3.8.1 Pesquisa de anticorpos para o vírus da arterite equina	29
3.8.1.1 Introdução e justificativa	29
3.8.1.2 Material e métodos	30
3.8.1.3 Resultados parciais e discussão	30
3.8.1.4 Conclusão	31

3.8.2 Padronização de um método de diagnóstico para o vírus da Língua Azul.....	31
3.8.2.1 Introdução e justificativa	31
3.8.2.2 Material e métodos	32
3.8.2.3 Resultados parciais e discussão	32
3.8.2.4 Conclusão	34
5 - CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXO A - Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	40

1 - INTRODUÇÃO

O ECSMV foi realizado na área de virologia e teve orientação do professor Mário Celso Sperotto Brum e supervisão do professor Eduardo Furtado Flores. O período de estágio ocorreu entre os dias 10 de agosto de 2015 a 13 de novembro de 2015. O ECSMV foi realizado no Setor de Virologia (SV/UFSM), pertencente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A equipe é composta por dois professores, um pós-doutorando, três doutorandos, três mestrandos e nove bolsistas/estagiários. O SV/UFSM é responsável por realizar diagnóstico e pesquisa das principais enfermidades de animais de companhia, produção e criação. Recentemente, o SV/UFSM foi transferido de local, ocupando um prédio novo composto de três andares. O primeiro andar é destinado à recepção do laboratório, à sala de preparação de amostras e realização de diagnósticos, sala de esterilização de materiais, sala de equipamentos, sala para confecção de meios e mix de PCR, salas de cultivo celular e viral, sala de imunofluorescência e imunohistoquímica, salas para técnicas de biologia molecular, de biossegurança, almoxarifado e estudos (FIGURA 1). No segundo andar estão localizadas as salas dos alunos da pós-graduação e dos professores, cozinha e refeitório. O terceiro andar ainda não está em uso, mas futuramente será destinado às salas de aula da graduação e da pós-graduação. O laboratório conta com uma estrutura ampla, dispondo de equipamentos novos e modernos, sendo referência no diagnóstico virológico veterinário no Brasil.

A virologia é uma das áreas de atuação do médico veterinário, e vem crescendo a cada ano. O desenvolvimento de novas pesquisas, principalmente no campo da biologia molecular, proporcionou grandes avanços nos métodos de diagnóstico, prevenção e controle de doenças que acometem animais domésticos e o homem. O presente relatório tem como objetivo descrever e discutir as principais atividades acompanhadas e/ou desenvolvidas durante o ECSMV.



Figura 1: A) Sala de cultivo de vírus e células. B) Sala de biologia molecular. C) Sala de lavagem e esterilização de materiais. D) Sala de equipamentos.

2 - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período do ECSMV foi possível acompanhar e realizar diversas técnicas de pesquisa e diagnóstico virológico, dentre as quais pode-se destacar, o cultivo celular e a inoculação viral, como técnicas essenciais na rotina da virologia. Ainda, foi possível acompanhar a disciplina de Virologia Molecular, ministrada para os alunos da pós-graduação e participar dos seminários de discussão de artigos científicos. Neste relatório serão descritas as principais técnicas e atividades realizadas e acompanhadas durante o ECSMV (TABELA 1 e TABELA 2).

2.1 Rotina laboratorial

As atividades laboratoriais destinadas ao atendimento ao público acontecem de segunda a sexta-feira, das 8h às 12h, e das 13h30min às 17h30min. A rotina laboratorial é realizada principalmente pelos bolsistas de iniciação científica e estagiários, que eram agrupados em duas equipes de três alunos, sendo uma equipe por turno. A primeira tarefa do dia era manter a organização do laboratório, priorizando a lavagem e a esterilização do material utilizado no turno anterior. Após cumprir essa tarefa, os bolsistas desenvolviam as atividades de diagnóstico de rotina e também participavam em projetos de pesquisa.

TABELA 1 – Atividades de diagnóstico acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Atividades	Número	%
Diagnóstico de Raiva	4	16,7
ELISA	1	4,2
IDGA	3	12,5
Imunofluorescência direta (IFD)	12	50,0
Isolamento e Cultivo Celular	2	8,3
PCR	2	8,3
Total	24	100

TABELA 2 - Atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.

Atividades	Número	%
Aulas de Virologia Molecular	*	---
Coleta de Amostras (sangue, swab e biopsia)	**	---
Congelamento de Células	25	13,3
Cultivo Celular	***	---
Cultivo Primário	5	2,7
Descongelação de Células	15	8,0
Discussão de Artigos	*	---
<i>Dot Blot</i>	1	0,5
Esterelização de materiais	*	---
Extração de DNA/RNA	4	2,1
Imunofluorescência (IFI/IFA)	10	5,3
Inativação de Vírus	1	0,5
Inoculação <i>in vivo</i>	4	2,1
Inoculação/Amplificação Viral	40	21,3
PCR	5	2,7
Recebimento e Processamento de Amostras	10	5,3
Soroneutralização qualitativa (<i>screening</i>)	8	4,3
Soroneutralização quantitativa	10	5,3
Teste de Diluição	25	13,3
Titulações	25	13,3
Total	188	100

*Atividade samanal; **Atividade realizada a campo, centenas de amostras coletadas; ***Atividade diária.

2.1.1 Lavagem e esterilização

A lavagem e esterilização de material são de extrema importância e essenciais para manutenção da rotina do laboratório. Estas etapas, no SV/UFSM são de responsabilidade dos estagiários/bolsistas e realizadas duas vezes ao dia. Para facilitar a lavagem, após o uso, os materiais eram separados de acordo com o tipo, e colocados em recipientes contendo uma solução de hipoclorito a 2% e mantidos submersos por, no mínimo, 24h, para a inativação de possíveis patógenos. O material era separado em: material cirúrgico, porcelana, plástico em geral e vidraria.

A vidraria e material de porcelana eram separados e preenchidos com hipoclorito ou água, de acordo com o uso. Quando utilizada em cultivo celular a mesma era preenchida com água, e em casos de uso de cultivo viral e ou suspeita de possuir contaminação ambiental, era preenchida com uma solução de hipoclorito a 2%. A lavagem era de responsabilidade de um bolsista, que realizava durante uma semana e sempre com o uso de equipamento de proteção individual (EPI). Para a lavagem era utilizado uma solução de sabão neutro a 1%. Após este passo, era realizado um enxague primário com água corrente da torneira. Em seguida, o material era enxaguado de 5 a 10 vezes com água bidestilada e, por fim, colocado em imersão por aproximadamente 15 min. Após esse período, o material era levado à estufa de secagem a uma temperatura de 50°C, onde permanecia por um período de 24 a 48 h até estarem completamente secos.

As pipetas de vidro, após o uso eram descartadas em cubas contendo água e uma solução de hipoclorito a 2%. Após o final de cada turno as cubas eram recolhidas e as pipetas armazenadas em bandejas. Posteriormente, os algodões contidos na extremidade de cada pipeta eram removidos e lavadas em água corrente por uma hora. Após esse período, as pipetas permaneciam submersas em água bi-destilada por aproximadamente 15min e, posteriormente, levadas a estufa de secagem. Microtubos, ponteiras e tampas de borracha, eram lavados juntos em um balde com uma solução de são neutro a 1% e posteriormente enxaguados de 5 a 10X em água corrente e 2 a 4X em água destilada. O material cirúrgico era limpo com o auxílio de esponja e enxaguado em água corrente.

Após secagem, o material era embalado de acordo com a forma de esterilização, calor seco ou calor úmido. A vidraria destinada ao forno era embalada com papel alumínio e papel pardo, e vedado com barbante. Placas de Petri eram embaladas separadamente, somente com

papel pardo e fita crepe. Materiais do tipo cirúrgico eram somente embalados com papel alumínio. As pipetas de vidro recebiam algodão na extremidade oposta à pipetagem e eram colocadas em cubas de metal.

Alguns vidros continham um anel de plástico para melhor vedação e, portanto, não era possível sua esterilização no forno. Desta forma, os mesmos eram embalados somente com papel pardo, vedados com barbante e levados a autoclave. Microtubos, tampas de borracha ou silicone eram colocados em frascos de vidros e vedados da mesma forma já descrita acima. Outros materiais como, tubos de centrifugação de 15 e 50ml, e calhas, eram embalados separadamente com papel pardo e fita crepe. Ponteiras de plástico eram colocadas em suas respectivas caixas e lacradas com fita de autoclave. Todo e qualquer material de forno ou autoclave era datado para um melhor controle da esterilização, garantindo assim uma melhor rotatividade.

O tempo de esterilização por calor seco era de uma hora, sendo esse tempo cronometrado a partir do momento em que a temperatura chegasse a 180°C. Após esse período, o forno era desligado e o material só era retirado após a temperatura chegar à 60°C. A esterilização pelo método de autoclave (calor úmido) era destinado aos materiais de plástico ou que não podiam ser expostos à temperaturas acima de 125°C. O material era organizado no interior da autoclave de modo que permitisse a circulação do vapor, garantindo assim uma melhor distribuição de calor. A tampa da autoclave era fechada e ligada com a chave na posição máxima e, em seguida, a válvula de vapor era totalmente aberta até a liberação de vapor. Após isto, a válvula de vapor era fechada e aguardava-se o manômetro atingir a pressão e temperatura de trabalho, cerca de 1kgf/cm² a 121°C. Ao atingir essa marca o chave de temperatura era regulada para a posição mínima e iniciava-se a cronometragem de 15 min. Ao final deste tempo, a autoclave era desligada e o material retirado após a pressão chegar a 0 kgf/cm². Posteriormente, o material era levado à estufa de secagem por aproximadamente, 24h.

2.2 Diagnóstico

O SV/UFSM recebe amostras para diagnóstico de todo o Brasil, principalmente do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. As amostras são entregues diretamente no laboratório

pelos médicos veterinários ou produtores, ou então são encaminhadas via correio. Todas as amostras devem ser encaminhadas junto com a ficha de requerimento de exames. Assim que são recebidas, o requerimento e as amostras são avaliadas. Caso as amostras sejam impróprias para o diagnóstico, as mesmas são recusadas e o médico veterinário responsável é notificado. Após isto, as amostras são protocoladas e recebem um número de identificação, sendo que os dados do proprietário, médico veterinário e um breve histórico do caso são registrados em um livro e no sistema informatizado do laboratório. Se necessário, as amostras são centrifugadas, aliquotadas e devidamente acondicionadas. O SV/UFSM trabalha em parceria com outros laboratórios da UFSM, tais como Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) e Laboratório de Leptospirose (LABLEPTO). Desta forma, quando são requeridos exames para um destes laboratórios, as amostras são aliquotadas e redistribuídas.

Cada bolsista ou pós-graduando é responsável por realizar determinado diagnóstico. Eventualmente quando o volume de amostras era muito grande, os estagiários curriculares eram designados a ajudar. Na QUADRO 3 estão listados os métodos e os diagnósticos realizados no SV/UFSM.

QUADRO 3 – Relação de enfermidades e/ou suspeitas e as técnicas de diagnóstico disponíveis no SV/UFSM.

Espécie	Enfermidade/Suspeita	Técnica de Diagnóstico
Bovina	Herpesvírus Bovino e Vírus da Diarreia Viral Bovina	ICC, SN, PCR
	Leucose Bovina	IDGA
	Vírus da Raiva	IFD, ICC
	Vírus Sincicial Respiratório	PCR
	Vaccinia, Estomatite Papular, Pseudovaríola	PCR
	Coronavírus e Rotavírus	ME
Equinos	Herpesvírus Equino	SN, ICC, PCR
	Coronavírus e Rotavírus	ME
	Vírus do Nilo Ocidental, Vírus da Influenza e Vírus das Encefalomyelites Leste, Oeste e Venezuelana	PCR
	Vírus da Arterite	ICC, PCR
	Vírus da Raiva	IFD, ICC

Ovinos	Ectima Contagioso e Vírus da Língua Azul	PCR
Caninos	Vírus da Raiva	PCR
	Cinomose, Parvovirose e Adenovírus 1 e 2	Cromatografia
Felinos	Calicivírus e Herpesvirus	ICC
	Vírus da Leucemia Felina e Virus da Imunodeficiência Felina	Cromatografia
	Coronavirus Felino	PCR
Silvestres	Raiva	ICC, IFD

ICC (Isotopo em cultivo celular); SN (soroneutralização); PCR (Reação em cadeia da polimerase) IDGA (imunodifusão em gel de ágar); ME (Microscopia eletrônica); IFD (imunofluorescência direta)

2.3 Cultivo celular

Essencial para um laboratório de virologia, cultivar células é um desafio exercido diariamente, que exige técnica, paciência e experiência. Uma vez que o SV/UFSM possui um dos maiores acervos de células do Brasil, no período de estágio foi possível manipular diversas linhagens celulares, dentre elas células de rim de felino (CRFK), células de rim de macaco-verde africano (VERO), células de rim de hamster (BHK-21), células de rim bovino (MDBK), células resistentes a infecção por BVDV (CRIB), células de rim de coelho (RK-13), e também com cultivos primários, como o fibroblasto de embrião de galinha (FEG) e cultivo primário de rim canino.

As células eram mantidas em garrafas de vidro ou de plástico com meio essencial mínimo (MEM) ou Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMi) suplementadas com antibióticos e antifúngicos. Adicionalmente, usava-se 10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro equino, de acordo com o tipo de célula. As passagens eram realizadas conforme a utilização ou quando atingissem 100% de confluência do tapete. Células de origem primária requerem uma atenção especial, possuem uma exigência maior, pois ainda não são adaptadas ao cultivo *in vitro*, sendo necessário monitorá-las mais frequentemente, e suas passagens são realizadas em intervalos maiores e com cuidados adicionais de manipulação.

2.3.1 Células de linhagem

São células adaptadas *in vitro*, e que geralmente possuem uma origem tumoral, como é o caso das células HeLa, oriundas de um tumor de cérvix uterino humano (ATCC CELL BIOLOGY, 2015). Essas linhagens tendem a se perpetuar por centenas de passagens quando comparadas às linhagens primárias. Apesar de possuírem características de seu tecido original, com o decorrer das passagens elas tendem a sofrer transformações.

2.3.2 Cultivo Primário

Ao contrário das linhagens celulares, os cultivos celulares primários possuem número limitado de passagens e características muito semelhantes ao do seu tecido de origem. Desta forma, tornam-se candidatos ideais à infecção por vírus que estão circulando na natureza. Durante o estágio foi possível produzir cultivo primário de pulmões e rins de fetos de cães, e cultivos de ovos embrionados. Os cultivos primários de ovos embrionados e de fetos seguem protocolos semelhantes, sendo descrito neste relatório a produção do fibroblasto embrionário de galinha (FEG).

A FEG é obtida de ovos embrionados com nove dias de vida. O sacrifício do embrião foi realizado a uma temperatura de 9°C durante 30min. Após a desinfecção da casca com álcool iodado, foi realizado um orifício na casca por onde o embrião foi retirado. Em seguida, o pescoço, membros e vísceras foram removidos, restando somente o tronco que foi lavado em PBS 1X para retirar hemácias (tóxica para o cultivo). Com o auxílio de cadinho e pistilo, os fragmentos dos fetos foram macerados. Após eram transferidos para um frasco contendo tripsina, onde permaneciam em um agitador a uma temperatura 37°C por 30min. A tripsina atua individualizando as células dos tecidos macerados.

Após esse período a solução, contendo tripsina e células, foi filtrada com auxílio de uma gaze e, posteriormente, centrifugada a 3.500 rpm/10min. Os restos de tecidos que ficaram contidos nas gazes foram novamente adicionados à tripsina, repetindo o mesmo processo. O *pellet* formado após a centrifugação continha restos de tecido e hemácias, sendo necessário realizar lavagens para remover as hemácias. Para isso, o sobrenadante foi

descartado, e o *pellet* ressuspensão com 5ml de MEM concentrado duas vezes em antibiótico (MEM 2X) e, novamente, centrifugado. O processo foi repetido em média três vezes até se obter um *pellet* esbranquiçado e livre de hemácias.

Por fim, as células foram ressuspensas e transferidas para garrafas de cultivos contendo MEM 2x antibiótico e 20% de soro fetal bovino. Após duas horas de incubação em estufa de CO₂ a 37°C o meio e soro foram trocados para retirar as células mortas no sobrenadante.

O cultivo primário de FEG foi utilizado para amplificação do vírus da cinomose (CDV), e para posteriormente ser utilizado em testes sorológicos. A manutenção das células FEG se mostraram extremamente difícil, com uma vida útil curta, em média de três passagens e desta forma se tornando inviáveis para a rotina de diagnóstico do laboratório.

2.3.3 Congelamento de células

O congelamento celular é uma forma de conservar linhagens celulares e cultivos primários que não estão sendo usados na rotina, ou então para assegurar um estoque a longo prazo. Para realizar a técnica foi preciso usar células com aproximadamente 24h de cultivo que estivessem com um tapete pré-formado. Inicialmente, as células foram individualizadas utilizando tripsina, ressuspensas, transferidas para um tubo de 15ml e centrifugadas por 4 min a 1.500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi ressuspensão com MEM, e adicionado a uma solução de congelamento (composta por 50% de soro fetal bovino, 40% de MEM e 10% de dimetilsulfóxido - DMSO). Após, foram aliquotadas em criotubos etiquetados com nome, passagem, data e pessoa responsável pelo procedimento. As ampolas foram mantidas a -20°C por uma hora e, posteriormente, transferidas para uma temperatura de -80°C dentro de uma caixa isotérmica, onde permaneciam por 24h. Após esse período, as ampolas foram transferidas para botijões de nitrogênio líquido a -196°C onde podem permanecer armazenadas por anos.

2.3.4 Descongelamento de células

A técnica de descongelamento celular deve ser realizada no menor tempo possível, pois o DMSO em temperatura ambiente é extremamente tóxico para as células (ALVES & GUIMARÃES, 2010). Após retirar a ampola do nitrogênio líquido, a mesma era descongelada em banho-maria a 37°C e centrifugada por 2 min a 1.500 rpm. Em seguida, o sobrenadante era desprezado e o *pellet* ressuspensão com MEM e as células eram adicionadas à garrafas T-25 contendo meio (específico para cada tipo celular) e 20% de soro fetal bovino ou equino. Após duas horas de incubação em estufa de CO₂ a 37°C, as células eram observadas em microscópio óptico e, caso houvesse células no sobrenadante, o meio e o soro eram trocados, evitando assim, que células mortas se tornassem tóxicas para as outras já aderidas. Após descongeladas as células eram amplificadas e utilizadas de acordo com a necessidade da rotina e sendo uma parte novamente congelada para repor os estoques.

2.4 Amplificação viral

O isolamento e amplificação viral podem ser realizados em cultivo celular, ovos embrionados ou em animais susceptíveis. A amplificação viral tem como objetivo aumentar o número de partículas víricas que serão posteriormente utilizadas em técnicas de diagnóstico ou, no caso do isolamento viral, aumentar o número de partículas até o limite de detecção. O método mais usado durante o estágio foi a inoculação em cultivo celular, por ser um método disponível no SV/UFSM, pela praticidade e por não envolver questões éticas relacionadas ao uso de animais.

A inoculação e a amplificação viral eram realizadas em garrafas de cultivos T-25, T-75 ou em placas de poliestireno com seis cavidades. As células a serem inoculadas eram preparadas com antecedência de 18 a 24h a inoculação. Para a inoculação, o sobrenadante das células era removido e a suspensão viral ser inoculada era adicionado a com um volume suficiente para cobrir as células. A adsorção viral era realizada por aproximadamente duas horas a 37°C, sendo que após esse período o meio de cultivo e 5% de soro era repostos. Este período é necessário para que as partículas víricas se liguem as receptores celulares e

posteriormente façam a penetração. As células inoculadas eram incubadas em estufa de CO₂ por um período de, aproximadamente, 48-72h, e monitoradas diariamente. Após apresentar efeito citopático, as culturas eram congeladas e descongeladas três vezes para garantir uma completa liberação das partículas virais presentes no interior das células. Em seguida, o sobrenadante coletado era aliquoteado em microtubos de 0,2 ml e titulado.

Durante o estágio foi realizado a inoculação e amplificação de diferentes espécies de vírus, entre eles, o vírus da febre amarela (YFV, amostra 17D), o vírus da cinomose canina (CDV), o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), o vírus da arterite equina (EAV), o vírus da língua azul (BTV), o vírus da vaccinia (VACV) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). As atividades relacionadas ao vírus da febre amarela englobaram a amplificação e caracterização parcial de do vírus vacinal (cepa 17D) e dois quimeras construídos a partir deste. Os dois quimeras possuíam as regiões que codificam as proteínas do envelope do vírus do Nilo Ocidental (WNV) ou do vírus da encefalite de *Saint Louis* (SLEV) em um *backbone* do vírus da febre amarela cepa 17D. O objetivo da produção desses mutantes era utilizá-los como um possível vetor para vacinas de equinos. A caracterização dos mutantes foi realizada por diversas passagens dos mesmos em células de rim de hamster (BHK-21) para posterior análise da estabilidade do gene inserido e expressão gênica em horários pré-determinados, bem como para estudos de curvas de crescimento viral.

Também foram amplificados e titulados os vírus CDV e CPV-2, com o objetivo de padronizar testes de soroneutralização (SN) para uso na rotina do SV/UFSM. O CDV foi amplificado em células de cultivo primário de rim canino e em células FEG. O CPV-2 foi amplificado em células CRFK, e representou um grande desafio, pois após diversas tentativas de amplifica-lo seu título se mantinha baixo. Os vírus EAV e BTV foram cultivados em células RK-13 e em BHK-21, respectivamente. Ambos foram amplificados e titulados com o objetivo de desenvolver projetos de pesquisa que serão descritos na sequência deste relatório. O vírus vaccínia foi amplificado e titulado em células VERO para ser utilizado como controle de testes moleculares, durante um teste de sensibilidade de uma PCR multiplex para vírus que causam lesões crostosas e vesiculares em bovinos, que está em padronização no SV/UFSM. A cepa Singer do BVDV foi amplificada e titulada para ser utilizada no diagnóstico de rotina. Já os vírus BVDV-2 e BoHV-1, foram amplificados, titulados e posteriormente inativados, com o intuito de produzir uma vacina comercial.

2.5 Quantificação viral

A quantificação viral por diluição limitante é uma técnica usada para estimar a quantidade de partículas víricas presentes em uma amostra. Por se tratar de uma técnica extremamente simples e confiável é a mais utilizada na rotina do SV/UFSM. Para quantificar os vírus amplificados, uma placa de poliestireno de 96 poços foi preparada previamente com células susceptíveis ao vírus específico. Foram realizadas diluições seriadas na base 10. Para isso, sete microtubos contendo 900µl de meio foram preparados, e no primeiro tudo foi adicionado 100µl do vírus original (10^{-1}). O microtubo foi então homogeneizado e 100µl foram transferidos para o segundo tubo (10^{-2}) e, assim, sucessivamente até a diluição 10^{-7} . Após a diluição dos vírus, foram pipetados 50µl da diluição 10^{-1} na coluna 1, sendo realizadas oito réplicas da linha A até a H. Na coluna 2 o procedimento foi repetido com a diluição 10^{-2} , e assim por diante até 10^{-7} . A placa foi então incubada em estufa de CO₂ a 37°C, durante 48 a 72h. Após este período, o número de poços com efeito citopático por diluição foi contabilizado e o título calculado de acordo com os índices acumulados conforme descrito por REED & MUENCH (1938).

2.6 Soroneutralização

Soroneutralização é o método utilizado para detectar e quantificar anticorpos neutralizantes presentes em uma amostra de soro. Durante o ECSMV, este método foi utilizado para titular anticorpos para BTV, CPV, BoHV-2 e EAV em amostras de soro de bovinos e equinos encaminhadas para diagnóstico no SV/UFSM. A técnica foi realizada em placas de poliestireno de 96 cavidades. As diluições de soro teste utilizadas variaram para cada vírus, e as amostras foram desafiadas frente a 100 DICC₅₀ (doses infectantes para 50% do cultivos celulares) do vírus. A mistura soro-vírus foi incubada por 2 horas a 37°C. Após esse período foram adicionadas células susceptíveis e as placas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ por um período de 48 a 72h. A ausência de efeito citopático (ecp) indicou a presença de anticorpos neutralizantes na amostra, sendo que a recíproca da maior diluição de soro capaz de prevenir a replicação viral correspondeu ao título de anticorpos.

2.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O teste de PCR é uma importante ferramenta molecular que auxilia na pesquisa e no diagnóstico de doenças víricas. Ao longo do estágio foi possível acompanhar e/ou realizar testes de PCR para herpesvírus equino (EHV-1), vírus da vaccínia (VACV) e vírus da mamilite herpética (BoHV-2). Antes de realizar a reação em cadeia da polimerase foi preciso extrair o DNA total da amostra. Uma vez que todos os vírus testados na PCR se tratavam de vírus DNA, o método escolhido para extração foi por fenol/clorofórmio.

Para iniciar a técnica de extração, as amostras de tecido foram pesadas e maceradas (50 a 150 mg do tecido). Em seguida, o tecido macerado foi ressuspensão com 10% de solução de Tris-EDTA (TE) (10% peso:volume). Após, foram adicionados 20µg/mL de RNase A e 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio). As amostras foram incubadas em banho seco a 56°C por 15-30 min. Ao final deste período foi adicionado 1mg/mL de proteinase K. As amostras foram novamente incubadas sob agitação constante a 56°C por mais 1h ou até a digestão total do tecido. Em seguida, foi adicionada a solução de fenol:clorofórmio na proporção de 1:1. Os tubos foram agitados e centrifugados a 9000rpm por 10min. A fase aquosa superior foi coletada, evitando-se coletar a fase intermediária, e novamente foi adicionada a solução de fenol e clorofórmio. Esta etapa foi repetida até limpeza total da fase intermediária. A fase aquosa superior foi então coletada e mensurada e adicionado 2,2 vezes do seu volume de etanol 100% e 10% do volume de acetato de sódio 3M. Novamente as amostras foram centrifugadas a 9000rpm por 5-10 min. Em seguida, foi realizada a lavagem do *pellet* de DNA com etanol 75%. Então os microtubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante foi novamente removido. Os tubos foram abertos e o *pellet* permaneceu secando por alguns minutos em temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi ressuspensa com TE aquecido (50-100µl) e o DNA mensurado.

Após a extração do DNA, iniciou-se o processo de preparo do mix de PCR. O mix é calculado de acordo com a quantidade de DNA mensurada em cada amostra. Nestas reações foram utilizados os seguintes reagentes: tampão da enzima, deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), cloreto de magnésio, oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), Taq DNA polimerase e DNA total da amostra. As reações foram realizadas num volume de 25µl, utilizando 2µl de DNA molde, MgCl₂ 2,5 mM, 10 mM de dNTP, 10% do volume total de tampão de reação e 1 unidade de Taq DNA polimerase. Na sequência, as amostras foram colocadas em um

termociclador submetidas à variações cíclicas de temperaturas e tempo. A desnaturação inicial ocorreu a 95°C durante 10 min, seguido por 30 ciclos de 95°C por 60s para desnaturação, 50°C durante 60s para anelamento dos *primers*, e 72°C durante 60s para extensão das cadeias, e uma extensão final de 7 min a 72°C.

O resultado da PCR foi analisado em gel de agarose, onde os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese, 60V por 30-40 min. Para a PCR do EHV-1, foi preparado um gel de agarose de 1,5% em 50ml de uma solução de Tris, ácido acético e EDTA (TAE). A agarose foi solubilizada em micro-ondas e homogeneizado a cada minuto. Em seguida a solução foi colocada em uma cuba de eletroforese onde permaneceu até se solidificar. Os produtos de PCR (10 µL) que foram carregados no gel de agarose foram previamente misturados com 2 µL de GelRed® (Biotium, CA, EUA) e 4 µL de tampão de corrida composto por glicerol. O primeiro poço do gel foi reservado para o marcador de peso molecular, e o restante dos poços foram destinados às amostras testadas. Após o carregamento do gel, a eletroforese ocorreu por aproximadamente 30-40 min, a 60-70V, e a leitura do gel foi realizada em transluminador. As amostras eram comparadas com um marcador de peso molecular comercial.

2.8 Inativação viral

A inativação tem como objetivo eliminar a capacidade de infecção do vírion, sem alterar sua capacidade antigênica. Durante o período de ECSMV foram inativados os vírus BVDV-1 (NADL/IBSP4) e BVDV-2 (M35), além do BoHV-1 deletado na glicoproteína E (BoHV-1/gE). Os vírus inicialmente foram amplificados e titulados em células MDBK livres de pestivirus, testadas através de imunofluorescência indireta (IFI). O objetivo do experimento foi verificar qual seria o melhor tipo de adjuvante utilizado para se produzir uma vacina experimental.

A inativação foi realizada através de um método químico, utilizando o reagente etilenoamina binária (BEA). Para inativar os vírus, foi adicionado 1% de BEI à solução de vírus, e esta permaneceu por 48h em agitador a 37°C. Posteriormente, foram realizadas três passagens dos vírus submetidos à inativação em células MDBK, e ao final da terceira passagem foi realizada IFI comprovando total inativação viral. Em seguida a solução inativada

dos três vírus foi misturada com quatro adjuvantes, sendo eles: montanide gel 01, montanide gel 02, emulsigem e hidróxido de alumínio (alhidrogem 2%). As vacinas foram aplicadas em 4 grupos distintos com 12 bovinos cada. Os animais foram imunizados no dia 0, e nos dias 60 e 360 foram realizados reforços da vacina. Nos dias 0, 30, 60, 120 e 360 foram realizadas coletas de sangue para monitoramento da resposta imune.

3 - DISCUSSÃO

3.1 Diagnóstico

O SV/UFSM recebe amostras de todo Brasil, principalmente Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, sendo estas em sua grande maioria encaminhadas via correio. Boa parte destas amostras são enviadas por médicos veterinários, representantes de proprietários, cooperativas e empresas. Durante o estágio, dentre as atividades de diagnóstico, um dos aspectos que mais chamou a atenção foi a péssima condição em que muitas amostras chegaram ao laboratório, como tubos boiando em gelo derretido, amostras sem identificação e sem resfriamento adequado. Sendo de extrema importância para o diagnóstico, a coleta e acondicionamento das amostras, que são consideradas as etapas fundamentais do processo.

Durante o ECSMV foi comum o recebimento de amostras com pouco volume, hemolisadas, soltas dentro de caixas isotérmicas, sem qualquer tipo de resfriamento ou até mesmo suspensas em gelo derretido. Outro problema grave foi a falta de identificação das amostras e/ou do requerimento de exames.



Figura 2: Amostras recebidas para diagnóstico virológico. A) Amostras inadequadamente armazenadas e transportadas, demonstrando estado avançado de hemólise, em caixa de papelão sem refrigeração. B) Amostras corretamente armazenadas e transportadas em caixa isotérmica, com gelo reciclável envoltas em jornal.

A má qualidade da amostra pode acarretar em toxicidade aos cultivos celulares ou até mesmo levar à inativação de agentes virais ou proteínas (anticorpos), impossibilitando sua

identificação. Na tentativa de evitar esses problemas, alguns laboratórios disponibilizam cartilhas, orientando passo a passo como deve ser realizada a coleta e o envio do material (CENCI, BRAGA, & BRITO, 2011). É recomendado que a coleta das amostras ocorra de forma mais asséptica possível, sempre utilizando EPIs (luvas de proteção) para garantir a integridade do profissional e para que não ocorra a contaminação da amostra por microrganismos ambientais (CENCI, BRAGA, & BRITO, 2011).

As amostras devem ser transportadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável ou gelo seco, em quantidade suficiente para manter a refrigeração durante o deslocamento. Para evitar que o material se quebre durante o transporte, deve-se colocar folhas de papel ou plástico bolha entre as amostras e o gelo, preenchendo espaços vazios (CENCI, BRAGA, & BRITO, 2011). O material deve ser identificado individualmente com nome ou número da amostra de forma legível. Além disso, o requerimento de exames deve acompanhar as amostras, envolto por plástico e anexado na tampa da caixa pelo lado de fora. Cabe ressaltar que alguns métodos de diagnóstico ou de pesquisa de agentes, requerem cuidados especiais, sendo preciso consultar o laboratório antes do envio.

Apesar da grande maioria das amostras serem encaminhadas por médicos veterinários, o descaso com a coleta e acondicionamento, reflete a falta de profissionalismo de alguns colegas e/ou falta de informação. Sendo necessário investir em campanhas de conscientização da importância do diagnóstico/confirmação laboratorial.

3.2 Cultivo celular: células de linhagem e cultivo primário

O cultivo de células se iniciou no início do século XX com Harrison em 1907 e Carrel em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado (ALVES & GUIMARÃES, 2010). No entanto, a grande evolução ocorreu após a descoberta dos antibióticos.

Com o aumento da preocupação com o bem estar animal, o cultivo celular surge como uma alternativa relativamente barata e eficiente, como ferramenta de diagnóstico e pesquisa (COSTA, 2005). Atualmente existem centenas de células adaptadas *in vitro*, sendo estas disponibilizadas em um banco mundial, que denomina-se ATCC – *American Type Cell*

Collection, ou frequentemente trocadas entre laboratórios. Cultivar células *in vitro* pode representar um grande desafio do ponto de vista de biossegurança, necessitando de cuidados especiais que se iniciam na lavagem e esterilização do material utilizado (SILVA, 2005).

Cada célula possui exigências e características únicas e, geralmente, são permissivas a infecção por vírus oriundos de suas espécies. Por exemplo, vírus de bovinos geralmente replicam em células de origem bovina; vírus de suínos geralmente infectam células de origem suína, e assim, sucessivamente (COSTA, 2005). No entanto, existem exceções, como por exemplo, o CPV que é um vírus de cães, mas que originalmente infectava felinos (SPIBEY, et al., 2008), e é capaz de replicar *in vitro* em células de origem felina (CRFK).

Existem basicamente dois tipos de células de cultivo: as células de cultivo primário e as linhagens celulares. Adaptar essas células às condições *in vitro* é um grande desafio, e requer técnica e paciência. Depois de adaptadas *in vitro* essas células podem durar, em média, 10 passagens ou se transformarem em linhagem contínuas.

As células de linhagem são células de cultivo primário adaptadas *in vitro* que geralmente possuem uma origem tumoral, podendo se perpetuar por centenas de passagens (MARTINS, et al., 2005). Também podem ser produzidas por transformação celular a partir do uso de antígenos tumorais. São amplamente usadas em pesquisas e diagnósticos por possuírem boa replicação. Entretanto, com o decorrer das passagens estas células tendem a sofrer alterações distanciando-se das características originais do tecido *in vivo*. Esta diferença entre o tecido original e a célula *in vitro*, pode dificultar ou até mesmo impedir a infecção viral, sendo necessário o uso de cultivos primários ou de celular com baixas passagens (FRESHNEY, 1983).

3.3 Amplificação viral

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando da maquinaria celular ou de algum organismo vivo para sua replicação. É possível amplificar vírus em animais, ovos embrionados e em cultivos celulares (MACLACHLAB & DUBOVI, 2011a). O uso de animais, hoje em dia, está caindo em desuso, devido às questões éticas relacionadas ao bem estar animal e ao alto custo de manutenção. Uma alternativa para este problema é o uso de ovos embrionados e de cultivos celulares. Os ovos embrionados permitem a amplificação de

alguns tipos de vírus como, por exemplo, o vírus da influenza equina e da língua azul (CLAVIJO et al., 2000). Além disso, podem ser usados na produção de vacinas, como é o caso da vacina humana para influenza (QUINN et al., 2003).

Os cultivos celulares possuem capacidade de multiplicação quase indefinida e são preferidos em laboratórios pela sua uniformidade, estabilidade e facilidade de manuseio, embora possam sofrer alterações que alterem a sensibilidade viral (BRUM & WEIBLEN, 2012). Cada vírus possui características únicas quando inoculadas em cultivo celular, podendo ser identificados ou monitorados de acordo com seu efeito citopático. Existem também aqueles que não causam lesões as células, sendo estes vírus denominados de não citopáticos (NCP). Para estes vírus é necessário realizar técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase ao final da passagem em cultivo celular para identificar os antígenos virais. E ainda é possível que o vírus não replique no cultivo celular, como por exemplo os papilomavírus, e por isso outros sistemas são utilizados (BRUM & WEIBLEN, 2012; QUINN et al., 2003;).

3.4 Quantificação viral

A quantificação viral permite estimar a quantidade de partículas víricas ou doses virais infectivas presente em determinada amostra (MACLACHLAB & DUBOVI,2011b).As técnicas que permitem a quantificação viral podem ser diretas como, por exemplo, a microscopia eletrônica realizando a contagem das partículas; ou indiretas estimando a quantidade de partículas infecciosas através de observação de ECP em cultivos celulares.

A diluição limitante, técnica já descrita neste relatório, é a mais utilizada para quantificação viral, pois é extremamente simples e possui boa confiabilidade. Entretanto, existem outros métodos indiretos capazes de quantificar partículas víricas, como o ensaio de placa, descrito por Dulbecco em 1952. Neste caso, diluições seriadas são inoculadas em placas de 6 cavidades com tapete pré-formado. Após a adsorção do vírus nas células, o inóculo é retirado, sendo adicionado um meio semi-sólido de ágar ou carboximetilcelulose. As culturas são incubados de 24 a 72 horas, variando conforme o agente viral inoculado. O meio semi-sólido impede a disseminação do vírus da célula, desta forma são formados focos de ECP (placas). Em seguida, a cultura é corada com cristal violeta e as placas virais são

contabilizadas. Através de cálculos matemáticos o título é expresso em unidades formadoras de placas (PFU). A principal diferença entre as técnicas é a forma que o título viral é expresso, onde na titulação por ensaio de placa tem seu título expresso em unidades formadoras de placa (PFU), sendo possível também observar as variantes fenotípicas do vírus. Já na diluição limitante o título é expresso em doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (TCID₅₀), não sendo possível diferenciar características fenotípicas, como a morfologia de placa.

Alguns vírus como influenza e parvovírus, possuem a capacidade hemaglutinante, sendo possível realizar sua quantificação através de técnicas de hemaglutinação (HA) (BRUM & WEIBLEN, 2012). Esta técnica é extremamente simples e possui baixo custo. São realizadas diluições seriadas da suspensão viral em microplacas de 96 cavidades com fundo em V. Posteriormente é adicionado uma solução de 1% de eritrócitos (galinha, cobaias ou coelhos, dependendo do vírus). As placas são então incubadas a 9°C por 60min. Na presença do vírus, os eritrócitos aglutinam e formam uma “rede” impedindo sua sedimentação. Na ausência do vírus, os eritrócitos livres rolam para o fundo da cavidade, formando um botão.

Também é possível estimar a carga viral de uma amostra por métodos moleculares. Através de diluições das amostras é realizado um *real time* PCR e posteriormente é realizada a análise quantitativa do material genético viral, através de métodos matemáticos e *softwares* (CHATTERLEA & SHINDE., 2012; STEPP et al., 2010;). A técnica de diluição limitante foi utilizada para titular todos os vírus relatados neste relatório e se mostrou ser simples e confiável.

3.5 Soroneutralização (SN)

A soroneutralização pode ser usada de forma qualitativa quando há apenas uma diluição (*screening*), ou na forma quantitativa, quando há várias diluições seriadas na base 2 ou 10. Esta técnica é muito utilizada para monitorar o *status* sorológico de rebanhos, diagnóstico de infecção aguda, avaliação da eficácia de vacinas ou em alguns casos se há ou não a circulação viral entre os animais. Entretanto, requer infra-estrutura para manter cultivos celulares, além de pessoal especializado. O tempo de realização da técnica até a obtenção do resultado pode levar até 96 horas.

Técnicas mais modernas como o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) aos poucos está substituindo o lugar da soroneutralização. Esta técnica possui baixos custos (quando realizada em grande escala), alta sensibilidade, especificidade e rapidez no diagnóstico, podendo ser realizada em poucas horas (COX et al., 2014). O ELISA é capaz de pesquisar anticorpos totais nos mais diversos tipos de amostras (leite, soro, secreções, etc.), podendo ser realizada em uma sala com os mínimos equipamentos.

A soroneutralização uma técnica clássica, mas ainda demonstra ser uma importante ferramenta de diagnóstico e monitoramento sorológico, apesar de existirem técnicas mais modernas.

3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Considerada uma técnica altamente sensível e específica, a PCR é uma técnica molecular relativamente recente que vem evoluindo a cada ano, sendo cada vez mais utilizada como ferramenta de diagnóstico e pesquisa (CHATTERLEA & SHINDE, 2012). Atualmente existem variações da PCR tradicional, sendo elas: a *nested*-PCR, a *multiplex*-PCR, a RT-PCR e o *real-time* PCR (BRUM & WEIBLEN, 2012). Basicamente, a técnica consiste em multiplicar, a níveis facilmente detectáveis, moléculas de DNA ou RNA alvos, denominadas *template* ou molde.

A extração do material genético das amostras é a etapa que precede a reação propriamente dita e tem como objetivo a obtenção do ácido nucleico. Após a maceração do material, enzimas como a RNaseA atuam degradando o RNA e o SDS tem função de detergente e atua degradando lipídios das membranas celulares. Em seguida, a proteinase K degrada proteínas, rompendo envoltórios e liberando material genético. Com o objetivo de purificar o material genético é adicionada a solução de fenol-clorofórmio que promove a separação do DNA da fase orgânica da amostra. Por diferença de gradientes o DNA tende a ficar na fase parte superior do tubo, fase líquida. Este passo é importante para eliminar substâncias que podem interferir na ação da polimerase.

Para realizar a identificação de um agente, uma região específica do genoma é selecionada e delimitada por oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Antes de iniciar a reação é preparada a mistura (mix) dos reagentes. Em um microtubo de 2ml são adicionados: *Taq*,

tampão da enzima, dNTP, DMSO, *primers* e água. A *Taq* é uma enzima que atua polimerizando seqüências de bases ou dNTPs (adenina, guanina, tiamina e citosina). Estes nucleotídeos são polimerizados de acordo com a seqüência de DNA molde. O magnésio possui a função importante doando íons que ajuntam na função enzimática da *Taq* (INNIS & GELFAND, 1990). O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente orgânico que atua na denaturação das fitas, permitindo a polimerização, desta forma os *primers* podem se ligar nas fitas e iniciar a polimerase.

A preparação da concentração do gel de agarose depende do peso molecular do produto amplificado na PCR. Assim, quando o produto de PCR for grande (acima de 600-700pb) o gel deve ser menos concentrado (0,8-1,2%). E quando o produto de PCR for menor (menos de 500pb) o gel deve ser mais denso (1,5 a 2%).

Quando as amostras foram carregadas no gel, utilizou-se a solução de gel red e o tampão de corrida. O gel red é um reagente intercalante de DNA e tem afinidade por essas moléculas, emitindo coloração laranja quando excitado por luz ultravioleta no transiluminador (INNIS & GELFAND, 1990). Além do gel red é utilizado o tampão de corrida no momento do carregamento das amostras no gel. O tampão é composto por glicerol e é utilizado para dar peso para a amostra, permitindo que ela penetre nos poços do gel de agarose que fica submerso em solução de TAE na cuba de eletroforese.

3.7 Inativação viral

O objetivo da inativação viral é inibir a capacidade infectiva do vírus e preservar a capacidade antigênica. A inativação viral pode ser realizada através de métodos químicos ou físicos. Tradicionalmente a inativação é realizada por métodos químicos com o uso de formol ou detergentes, como no caso do vírus influenza (SCHATZMAYR, 2003). Os agentes químicos mais utilizados são β -propiolactona e os derivados da etilenamina, entretanto eles podem promover alterações na conformação de epítopos virais, prejudicando a imunogenicidade do antígeno, além de necessitar longo tempo para obter o vírus inativado. (ACLACHLAB & DUBOVI, 2011)

Durante o ECSMV a inativação viral foi realizada com o objetivo de produzir vacinas experimentais inativadas para uso em bovinos. As vacinas inativadas são consideradas mais

seguras, pois não há multiplicação do agente viral no organismo, entretanto a resposta imune induzida é menor e sua duração mais reduzida quando comparada com vacinas atenuadas, sendo necessário o uso de adjuvantes e de doses reforço (MACLACHLAB & DUBOVI, 2011c). Atualmente, vacinas inativadas são produzidas através da expressão de proteínas imunogênicas em células de leveduras, insetos e mamíferos, sendo posteriormente purificadas.

3.8 Projetos de pesquisa desenvolvidos

Durante o ECSMV foi proposto o desenvolvimento de dois projetos de pesquisa, sendo eles denominados de: “Pesquisa de anticorpos para o vírus da arterite equina” e “Padronização de um teste sorológico e pesquisa de anticorpos para o vírus da língua azul”.

3.8.1 Pesquisa de anticorpos para o vírus da arterite equina

3.8.1.1 Introdução e justificativa

A arterite viral equina é uma doença viral e infecto-contagiosa, causada por um membro da família *Arteriviridae*. O vírus da arterite equina (EAV) é responsável por produzir lesões inflamatórias no endotélio dos vasos sanguíneos de equinos, especialmente nas arteríolas, causando doença respiratória, morte súbita e abortos. Além disso, garanhões podem excretar o vírus pelo sêmen por longos períodos (LIMA & OSORIO, 2012). Apesar do vírus ainda não ter sido isolado no Brasil, frequentemente são detectados anticorpos em amostras de equinos (FERNANDES & SOUZA, 1999; LARA et al., 2002; SOUZA et al., 1999;), o que sugere a circulação desse vírus entre populações de equinos. Por se tratar de uma doença de grande importância econômica para a produção de equinos o objetivo deste projeto foi verificar a ocorrência de anticorpos para o EAV em amostras de soro de cavalos oriundas de Brasília-DF e Passo Fundo-RS, submetidas ao diagnóstico de anemia infecciosa equina.

3.8.1.2 Material e métodos

O vírus foi amplificado e titulado em células RK-13, mantidas em garrafas de cultivo T75 contendo MEM e SFB 10%. Foi obtido o título viral de $10^{6,8}$ DICC₅₀/ml, sendo que a diluição de trabalho utilizada nos testes de soroneutralização (SN) foi de 1:2800. Foram testadas 952 amostras de soro de equinos provenientes de Brasília - DF, e 234 de Passo Fundo-RS, que inicialmente haviam sido coletadas para o teste de anemia infecciosa equina.

Para a realização SN foram utilizadas duas metodologias. Inicialmente foi realizado um teste de triagem para a identificação de amostras positivas. Para isso, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 cavidades em uma única diluição do soro (1:4). As amostras foram pipetadas em duplicada e incubadas com doses constantes dos vírus (100-200 DICC₅₀ por cavidade). Após 90 min de incubação a 37°C, foi adicionada a suspensão de células RK-13 e as placas foram novamente incubadas por um período de 96h. Após esse período foi realizada a leitura do teste e a ausência de efeito citopático indicou a presença de anticorpos na amostra. Posteriormente, as amostras positivas no teste qualitativo inicial, foram submetidas a SN titulada (quantitativa), onde foram repetidos os passos descritos acima, porém com o soro diluído de forma seriada, iniciando em 1:2 até 1:256. As amostras positivas foram agrupadas de acordo com os níveis de anticorpos em baixos (1:2 a 1:8), intermediários (1:16 a 1:64) e altos (acima de 1:64).

3.8.1.3 Resultados parciais e discussão

Até o momento final do estágio foram testadas 1185 amostras, sendo que 1,8% das amostras (n=22) apresentaram anticorpos para EAV no teste qualitativo, sendo três amostras de equinos provenientes do Rio Grande do Sul e as demais do Distrito Federal (n=19). Dentre as amostras positivas 88,8% (18) apresentaram títulos considerados baixos (1:2 a 1:8) e 18,1% (4) apresentaram títulos médios (1:16 a 1:64), sendo que nenhuma amostra apresentou títulos altos.

A soropositividade de amostras tanto do DF quanto do RS indica que o EAV está circulando em ambas as regiões, uma vez que não há vacinas disponíveis para esse agente,

evidenciando que os anticorpos detectados são resultantes de exposição prévia ao agente. Além disso, a presença de anticorpos em títulos baixos e médios pode indicar que esses animais não tiveram contato com o vírus recentemente. Embora o vírus nunca tenha sido isolado de amostras de equinos no Brasil, a sorologia positiva demonstra que pode existir circulação do vírus, sendo necessário tomar medidas preventivas e realizar o monitoramento sorológico do rebanho periodicamente.

3.8.1.4 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que há circulação do EAV entre equinos em duas regiões distantes do Brasil, e uma vez que os títulos detectados foram moderados a baixos é possível afirmar que a infecção dos animais não tenha ocorrido recentemente.

3.8.2 Padronização de um método de diagnóstico para o vírus da Língua Azul

3.8.2.1 Introdução e justificativa

O vírus da língua azul (BTV) é membro do gênero *Orbivirus* pertencente à família *Reoviridae*. A língua azul é uma enfermidade infecciosa, não contagiosa, transmitida por insetos, principalmente *Culicoides* spp. (MACLACHLAN et al., 1994). Os casos suspeitos devem ser notificados obrigatoriamente ao serviço veterinário oficial, pois podem interferir no comércio internacional de animais e subprodutos. A infecção é responsável por grandes perdas econômicas e acomete ruminantes em geral, mas principalmente ovinos (CONRATHS et al., 2009). Os principais sinais clínicos são inflamação das mucosas, febre acima de 41°C, hemorragia e edema generalizados. Os bovinos são considerados reservatórios da doença e raramente desenvolvem sinais clínicos, podendo servir de sentinelas (VERWOERD & ERASMUS, 2004).

O diagnóstico clínico e testes sorológicos comprovam que a doença está ocorrendo no Brasil, principalmente nos estados do norte (COSTA et al., 2006). No Rio Grande do Sul, foram descritos alguns casos (ANTONIASSI et al., 2009), e recentemente foi acompanhado um importante surto em diversas propriedades da região central do estado acometendo ovinos e causando a morte de um grande número de animais (BIANCHI et al., 2015, submetido). O teste padrão para o diagnóstico sorológico de BTV recomendado pela OIE é o IDGA, entretanto pode existir reação cruzada com outros *Orbvirus*. Assim, o objetivo deste projeto foi padronizar uma soroneutralização para identificação de anticorpos de BTV em bovinos e testar amostras desta espécie para identificar possíveis portadores assintomáticos.

3.8.2.2 Material e métodos

Para isso, amostras de soro de bovino de animais que estavam em contato com ovinos diagnosticados com BTV foram submetidas a uma soroneutralização com diluição única (triagem) de 1:10 para identificação de amostras positivas. As amostras eram todas reconhecidamente positivas no teste de IDGA, considerado teste ouro para o diagnóstico de BTV. As amostras de soro bovino foram selecionadas aleatoriamente no banco de soro do SV/UFSM e possuíam histórico desconhecido. O teste de SN foi realizado em placas de poliestireno de 96 cavidades as amostras foram pipetadas em duplicada e incubadas com doses constantes dos vírus (100-200 DICC₅₀ por cavidade). Após 90 min de incubação a 37°C, foi adicionada a suspensão de células BHK-21 e as placas foram novamente incubadas por 96h.

3.8.2.3 Resultados parciais e discussão

Foram testadas 73 amostras de soro bovino pela técnica de SN, sendo que 25 amostras tiveram resultado positivo, 42 foram negativas e seis suspeitas. Entre as amostras de bovinos testadas, 16 amostras também foram avaliadas pelo teste de IDGA. Dentre as quais 12 amostras tiveram resultados iguais para os dois testes e em quatro amostras os resultados

foram diferentes (FIGURA 3). Apesar do baixo número de amostras testadas, foi calculado o índice de concordância (87,5%) entre os dois testes, sendo que a SN possui 91,7% de sensibilidade relativa e 25% de especificidade relativa. Para os cálculos as amostras suspeitas foram desconsideradas.

		IDGA		
		Positivo	Negativo	
Soroneutralização	Positivo	a	b	a+b
	Negativo	c	d	c+d
		a+c	b+d	a+b+c+d

		IDGA		
		Positivo	Negativo	
Soroneutralização	Positivo	11	3	14
	Negativo	1	1	2
		12	4	16

FIGURA 3 – Comparação entre os resultados das amostras testadas por IDGA e SN para a presença de anticorpos para o vírus da lígna azul.

O teste de IDGA é recomendado pela OIE e é amplamente utilizado para o diagnóstico da infecção pelo BTV. O IDGA é um teste de detecta anticorpos totais (neutralizantes e não-neutralizantes) e possui limitações como baixa sensibilidade (capacidade de detectar níveis baixos de anticorpos) e especificidade (reações inespecíficas) (BRUM & WEIBLEN, 2012). O teste de SN tem a capacidade de detectar somente anticorpos neutralizantes, ou seja, anticorpos em quantidade suficiente para neutralizar a infecção do vírus na célula. Os resultados de sensibilidade e especificidade talvez possa ser explicado por isso.

3.8.2.4 Conclusão

O teste de soroneutralização foi padronizado com sucesso e podendo ser utilizado como um teste sorológico para monitoramento de rebanhos e auxiliar em futuros projetos de pesquisa. Entretanto, devido ao pequeno número de amostras avaliadas, é necessário realizar testes com um número maior de amostras, para se obter um resultado mais preciso e confiável.

5 - CONCLUSÃO

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária é o encerramento da graduação. Ao final deste período foi possível perceber que ainda existe um longo caminho a ser percorrido. O estágio é a oportunidade do acadêmico de aprimorar conhecimentos, conhecer novas realidades, além de ser uma porta de entrada para o mercado de trabalho. Durante o estágio o aluno é desafiado com relação aos seus conhecimentos adquiridos durante a graduação, assumindo responsabilidades como profissional. Os desafios do dia-a-dia, a oportunidade de conviver com profissionais da área e desenvolver atividades de pesquisa, contribuiu para o crescimento pessoal.

O local do estágio proporcionou liberdade para executar diversas técnicas de virologia clássica, como cultivo celular e soroneutralização e técnicas modernas como PCR, proporcionando o desenvolvimento de pesquisas e diagnóstico. O fato de estar inserido no ambiente acadêmico, o estágio também contribuiu para a obtenção de conhecimentos teóricos de virologia, despertando cada vez mais o interesse científico pela pesquisa. As aulas acompanhadas junto com alunos da pós-graduação de virologia molecular contribuíram para a melhor compreensão dos mecanismos virais e da interação virion/célula, facilitando a compreensão da cinética das doenças.

O trabalho em equipe em alguns momentos pode se tornar difícil, entretanto provou ser fundamental e indispensável para a manter a rotina laboratorial. A qualidade das amostras encaminhadas ao laboratório está diretamente relacionado com a rapidez e precisão do diagnóstico, uma vez que o diagnóstico clínico e a confirmação laboratorial deveriam andar juntas.

Contribuindo para diagnóstico de enfermidades, a virologia possui importante papel na sanidade animal e no controle zoonoses. Ainda esquecida pelos estudantes de medicina veterinária e técnicos de campo é uma área, que possui um grande potencial de expansão e oportunidades de emprego.

REFERÊNCIAS

ALVES & GUIMARÃES, Cultivo Celular In: **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde** p. 215-252, 2010.

ANTONIASSI, NADIA A. B. et al. Alterações clínicas e patológicas em ovinos infectados naturalmente pelo vírus da língua azul no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, vol.30, n.12, p. 1010-1016, 2010.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM. p. 55-80. 2012.

CENCI, A.; BRAGA, A. de C. & BRITO, B. G. et al; Coleta e remessa de amostras para diagnóstico laboratorial veterinário In: **Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2011. Boletim Técnico, n. 20.

CHATTERJEA, M. N. & SHINDE, R. Molecular Biology. In: **Textbook of Medical Biochemistry**. London: Jaypee Brothers Medical Publishers, 8º. Ed. p. 215-318, 2012.

CLAVIJO A. R. A. et al Isolation and identification of bluetongue virus **Journal of Virological Methods**, v. 87, p. 13–23 2000.

FRANZ J. CONRATHS et al., Epidemiology of bluetongue virus serotype 8, Germany **Emerging Infectious Disease Journal.**, v. 15, p. 433–435 2009.

COSTA J. R. R. et al Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58 p. 273-275, 2006.

COSTA, A. C.; Cultivo de Células Aplicada ao Diagnóstico Viroológico. In PERES, M. P & CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan p. 166-172 2005.

COX, K. L. et al. Immunoassay Methods. IN: SITTAMPALAM, G.S.; COUSSENS, N.P.; NELSON, H. et al. **Assay Guidance Manual [internet]**. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translation Sciences. Acessado em 17 Nov. 2015. Disponível online em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>

FERNANDES, W.R.; SOUZA, M.C.C. Determinação sorológica da arterite viral **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** v.6, n.3, p.147-150, 1999.

Flow Cytometer Designed to Improve Measurement in Liquid Samples. **GEN** v. 30, n. 20, 2015. Acessado em 17 Nov. 2015. Disponível online: <http://www.genengnews.com/gen-articles/new-method-for-rapid-virus-quantification/3480/>

FRESHNEY, R.J. **Culture of animal cells**. New York, NY: Wiley-Liss, p.6-7 1987.

INNIS, A. M. & GELFAND, D.H. Optimization of PCRs In: INNIS, M. A. et al. **PCR Protocols**. New York: Academic Press p.3-12 1990.

LARA, M.C.C.S.H. et al. Prevalência de anticorpos antivírus da arterite dos equinos em cavalos criados no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.54, n.3, p.223-227, 2002.

LIMA, M. & OSORIO, F.A. Arteriviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM. p. 646-649. 2012.

MACLACHLAB, J. N & DUBOVI. J, E. Antiviral Immunity and Prophylaxis. In: **Veterinary Virology**. San Diego editora Elsevier 4 edition p.75-99, 2011a.

MACLACHLAB, J. N & DUBOVI. J, E. Laboratory Diagnosis of Viral Infections. In: **Veterinary Virology**. San Diego editora Elsevier 4 edition p.101-122, 2011b.

MACLACHLAB, J. N & DUBOVI. J, E. The Nature of Viruses In: **Veterinary Virology**. San Diego editora Elsevier 4 edition p.3-14, 2011c.

MACLACHLAN N.J. et al. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. **Archives of Virology**, v. 136 p. 1–8 1994.

MARTINS, A, K, A. et al; Cultivo de Linhagem Permanentes. In: PERES, M. P & CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan p. 40-49 2005.

QUINN. B. K et al., **Viruses and Prions**. In: Concise Review of Veterinay Microbiology, Oxford: Blackwell Publishing, 2°. Ed. p.120-176, 2003.

REED, R.H., MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 27, p. 493-497, 1938.

SCHATZMAYR, G. H. New perspectives in viral vaccines **História, Ciências, Saúde-Manguinhos** vol.10 suppl.2 Rio de Janeiro. 2003.

SILVA, P.P.E.; Normas Básicas para se Trabalhar com Culturas Celulares. In: PERES, M. P & CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan p. 6-9 2005.

SPIBEY, N. et al. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus **Journal Veterinary Microbiology**v. 128, p.48–55 2008.

STEPP, P.C.; RANNO, K. A. & FERRIS, M. M. New Method for Rapid Virus Quantification

ATCC CELL BIOLOGY. Disponível em:
http://www.atcc.org/Products/Collections/Cell_Biology_Collections.aspx. Acessado em
08/11/15

VERWOERD D.W. & ERASMUS B.J. Bluetongue, In: **Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. (Eds), Infectious Disease of Livestock.** Oxford University Press Vol.2. 2^o ed., Cape Town p.1201-1220 2004

ANEXO A - Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.



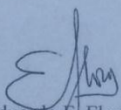
Setor de Virologia
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 17/11/15

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o acadêmico José Conrado dos Santos Jardim realizou o seu Estágio Prático Profissional do Curso de Medicina Veterinária da UNIPAMPA (matrícula 121440020) no Setor de Virologia da UFSM, entre os dias 10 de agosto e 13 de novembro de 2015, totalizando 450 horas. Neste período o acadêmico acompanhou e auxiliou na rotina de diagnóstico do SV/UFSM e teve oportunidade de acompanhar e participar de projetos de pesquisa desenvolvidos por mestrandos e doutorandos do Setor.

Sem mais, atentiosamente


Eduardo F. Flores
SV/UFSM
DMVP/CCR

Prédio 63A – Parque de Exposições
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, RS. 97105-900 – Fone/fax: (55) 3220-8034, 8853, 8851 ou 8055

www.ufsm.br/sv

setordevirologia@gmail.com

eduardofurtadoflores@gmail.com