

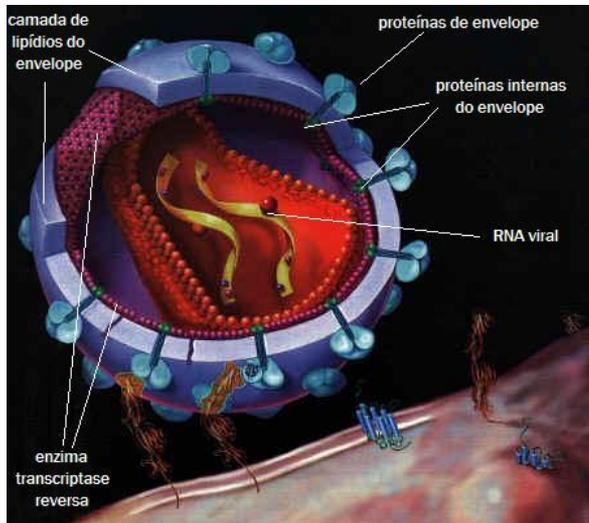


# Cultivo de Células Aplicado ao Diagnóstico Viroológico

Universidade Federal de Pelotas  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico  
Núcleo de Biotecnologia  
Curso de Graduação em Biotecnologia  
Disciplina de Engenharia Tecidual  
Prof.<sup>a</sup> Fernanda Nedel

Francine R. Philippsen  
Gabriela Alves Sabadin  
Karina Colonetti

# Diagnóstico Viroológico



- Vírus: Parasita intracelular obrigatório



Dificulta detecção, contagem e identificação

- Não se desenvolvem em meios de cultivo, necessitam a presença de células vivas

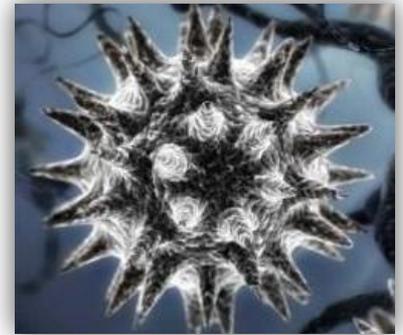
# Diagnóstico Viroológico

- Inicialmente: inoculação em animais
- Década de 1930: cultivos celulares
  - Advento dos antibióticos
  - Diagnóstico e estudo dos aspectos biológicos dos vírus
- Década de 1940: Reações baseadas no uso de anticorpos
- Década de 1980: Detecção do material genético viral



# Aplicações do Diagnóstico Viroológico

- Suporte a investigações clínicas e epidemiológicas
- Vigilância epidemiológica
- Certificação status sanitário
- Monitoramento de resposta vacinal
- Triagem de sangue em bancos de sangue
- Pesquisa do vírus e suas propriedades biológicas



# Aplicações do Diagnóstico Viroológico

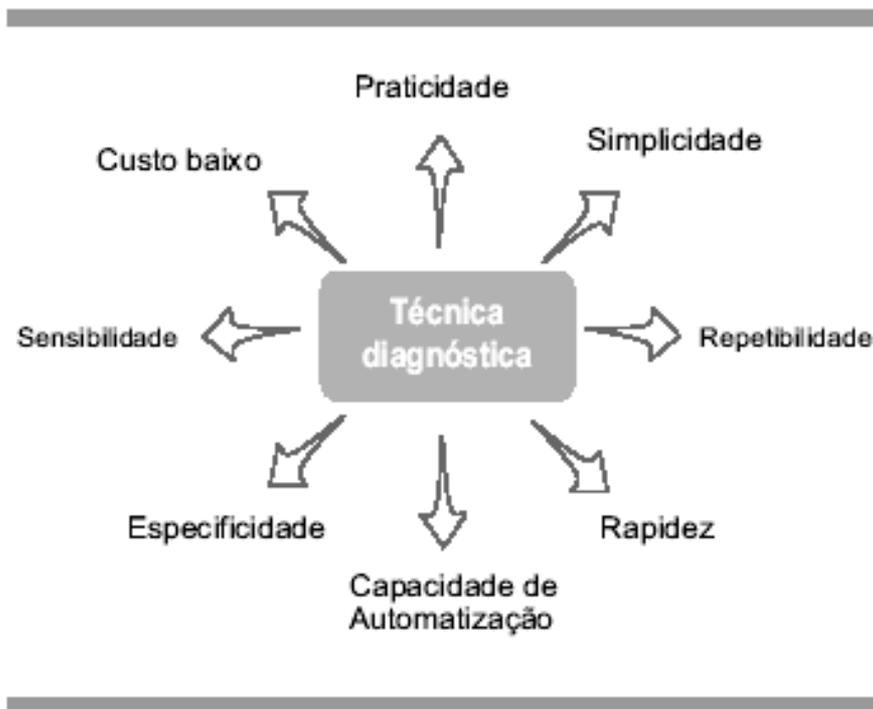


Figura 11.1. Propriedades desejáveis nos testes diagnósticos.

# Coleta e Acondicionamento da Amostra

- **Coleta** (Fase aguda)

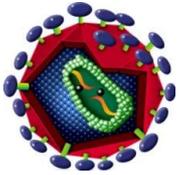
SÍNDROME	ESPÉCIME	COLETA	TRANSPORTE
respiratória	secreção nasal ou de garganta; aspirado nasofaríngeo	swab; sonda nasogástrica	meio de transporte; gelo/gelo seco
entérica	fezes	frasco	gelo/gelo seco
genital	secreção	swab	meio de transporte
ocular	secreção	swab	meio de transporte
pele	líquido/tecido de vesículas ou lesões sólidas	swab; raspagem; biópsia	meio de transporte; fixador/parafina
sistema nervoso central	líquor; fezes; secreções	seringa; frasco; swab	gelo/gelo seco; meio de transporte
qualquer	sangue	seringa	gelo/gelo seco
necrópsia	tecido/órgão relevante	procedimento cirúrgico	fixador/parafina

# Coleta e Acondicionamento da Amostra

- **Acondicionamento**
  - Manter as amostras a 4°C (Maiores períodos -70°C ou gelo seco)
  - Manter as amostras úmidas (Meios Hepes/Hanks, solução salina)
- Histórico clínico e epidemiológico - Suspeitas



# Métodos de Diagnóstico Viroológico



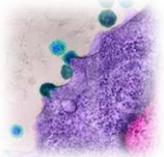
- **Métodos Diretos**

Deteccção do vírus, antígenos ou ácidos nucleicos virais.



- **Métodos Indiretos**

Deteccção e quantificação de anticorpos anti-virais específicos  
→ Resposta do hospedeiro à infecção



- **Isolamento**

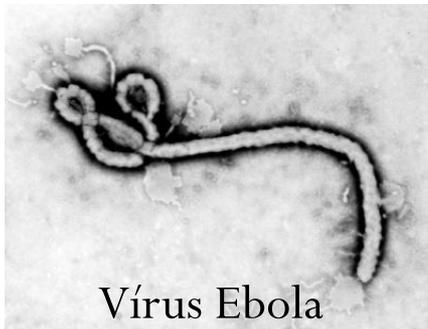
Isolamento e multiplicação em cultivos celulares, ovos embrionados ou animais susceptíveis

# Métodos de Diagnóstico Viroológico

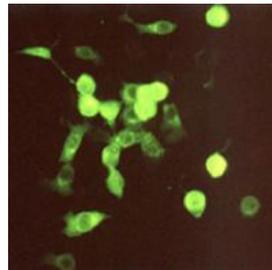
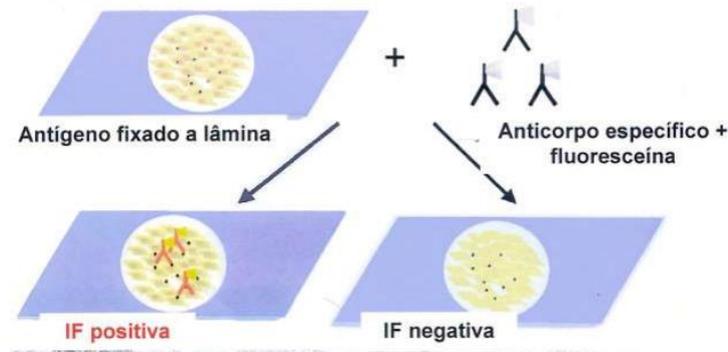
- **Métodos Diretos**

Deteccção do vírus, antígenos ou ácidos nucleicos virais.

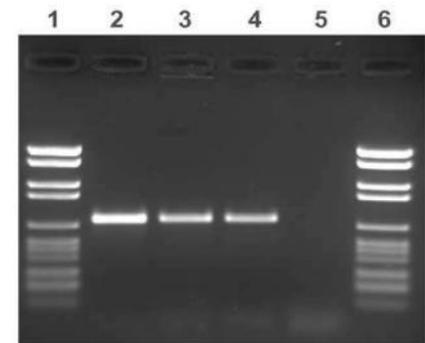
## Microscopia Eletrônica



## Imunofluorescência



## PCR



# Métodos de Diagnóstico Viroológico

- **Métodos Indiretos**

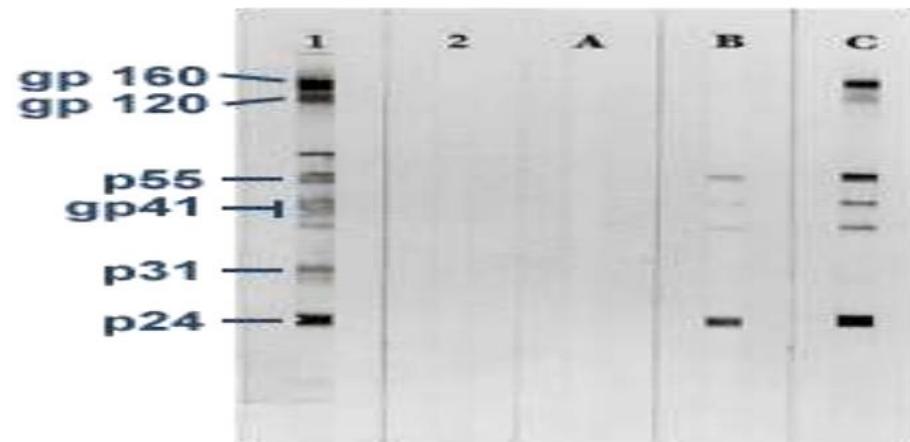
Detecção e quantificação de anticorpos anti-virais específicos

→ Resposta do hospedeiro à infecção

## ELISA



## Western Blot



1. C+

2. C-

A. Amostra -

B. Amostra

Indeterminada

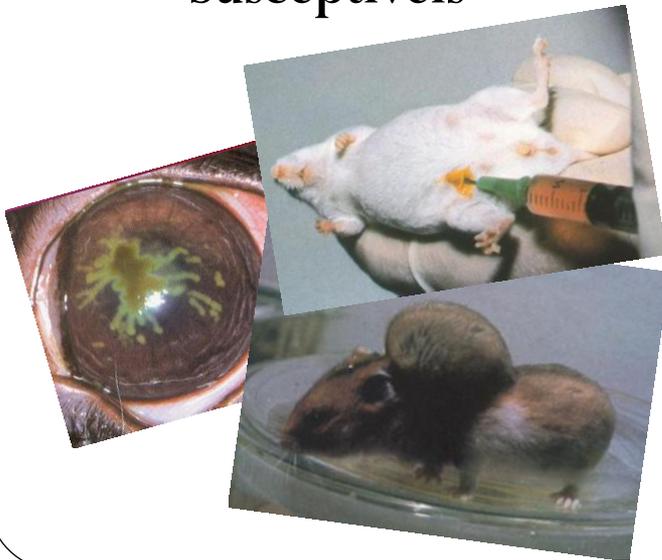
C. Amostra +

# Métodos de Diagnóstico Viroológico

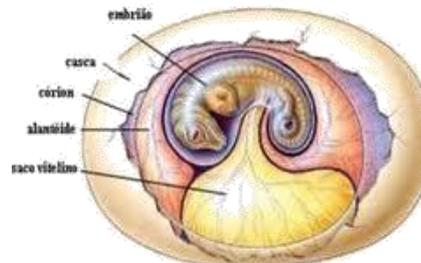
- **Isolamento**

- Método direto de diagnóstico virológico
- Obtenção do agente viável para estudos posteriores
- Isolamento e multiplicação em:

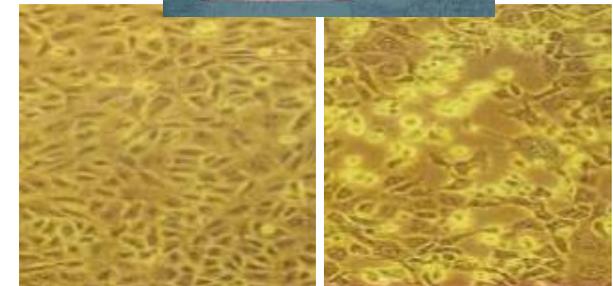
## Animais Susceptíveis



## Ovos Embrionados



## Cultivos Celulares



Células Vero infectadas com HSV

# Isolamento em Cultivo Celular (ICC)

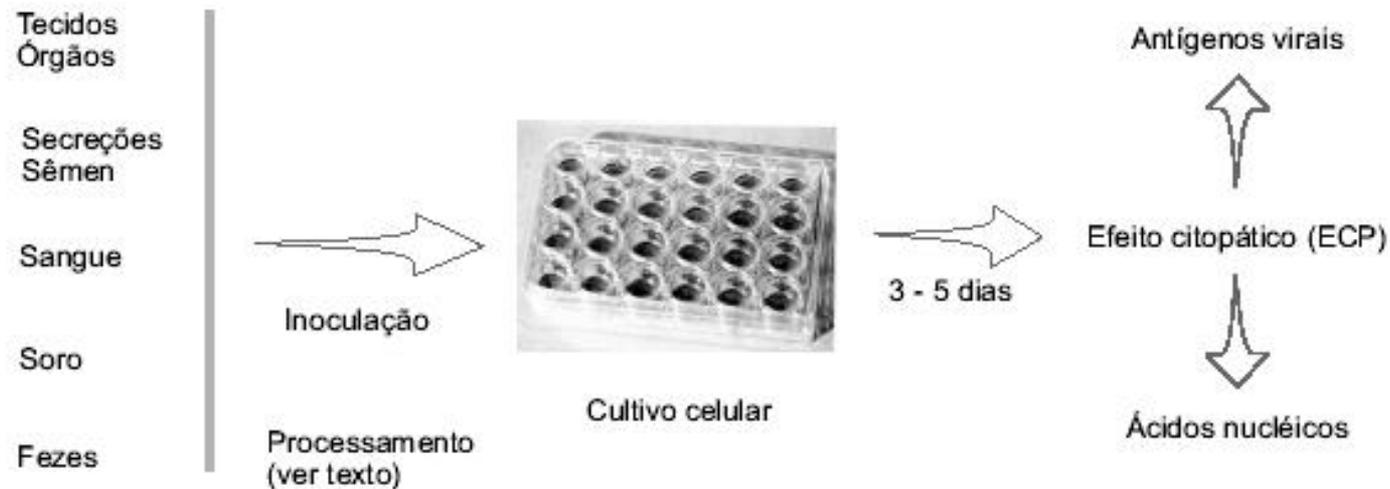
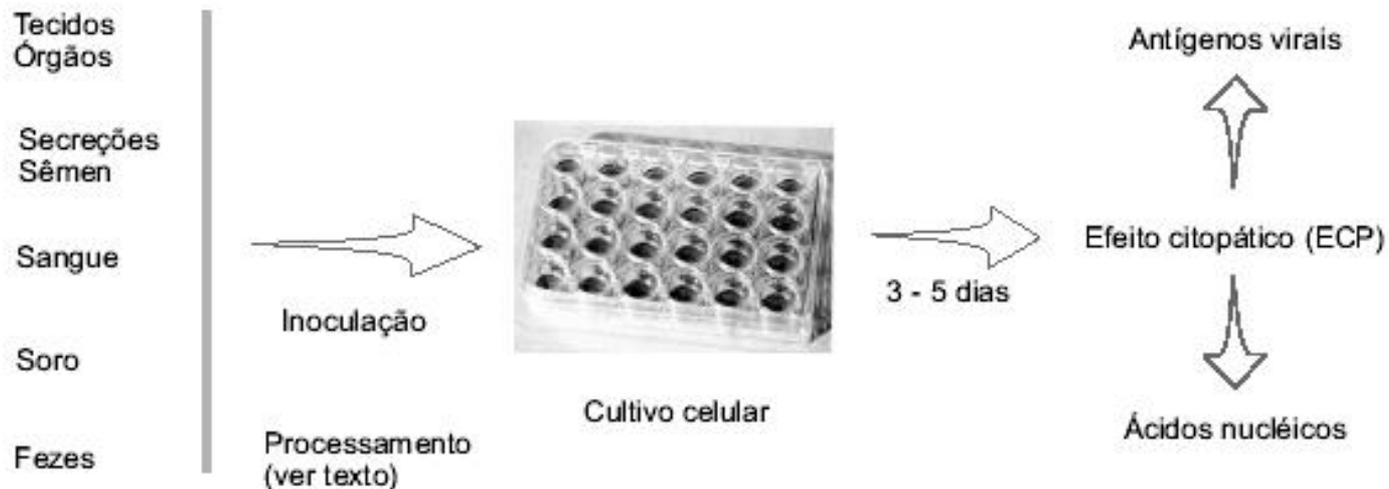


Figura 11.4. Protocolo para isolamento e identificação de vírus pela inoculação em cultivo celular. As amostras são inicialmente processadas e inoculadas em células susceptíveis aos vírus suspeitos. Os cultivos são monitorados por alguns dias para o aparecimento de efeito citopático (ECP). Ao final da terceira passagem do material ou quando aparecer ECP os cultivos são submetidos à identificação do agente por técnicas de detecção de antígeno ou de ácidos nucleicos. A presença de vírus não-citopáticos deve ser monitorada por IFA ou IPX. Deve-se proceder três passagens do material antes de considerá-lo negativo para vírus.

# Isolamento em Cultivo Celular (ICC)

- **Isolamento e Identificação do vírus:**
- *Através de sistemas vivos (cultura de células) nos quais os vírus são propagados.*
- Detecção direta do vírus, antígenos e genomas virais.



# Principais tipos celulares utilizados em diagnóstico viral

- Vero - células de rim de macaco verde;
- SK 6 - células de rim de suíno
- PK15 - células de rim de suíno
- MDBK – células de rim de bovino;
- MDCK – células de rim de cão;
- BHK – células de rim de Hamsters Baby.

VERO: quase todos os testes diagnósticos

Uso de linhagens específicas: melhor replicação viral e maior segurança da prova.

- Para as provas de soroneutralização de Aujeszky são utilizadas as células PK 15 ou SK6.

- As células de linhagem são usadas na replicação e titulação vírica, isolamento viral e como substrato celular para as provas de soroneutralização.
- A escolha do melhor tipo celular a ser usado para o teste diagnóstico depende de três fatores:
  - Especificidade viral;
  - Linhagem celular;
  - Número de passagem dentro da linhagem.

- A escolha do tipo de célula adequada ao vírus que se pretende isolar é crucial.
- para isolamento de poliovírus: culturas primárias ou células de linhagens diplóides de rim de macaco verde (GMK) ou rim de Macaca mulata (LLC-MK).
- Para isolamento de adenovírus: células de carcinoma epitelial humano (HEP-2) e HEK293 (rim de embrião humano)
- Sarampo e Herpesvírus: VERO (rim de macaco).

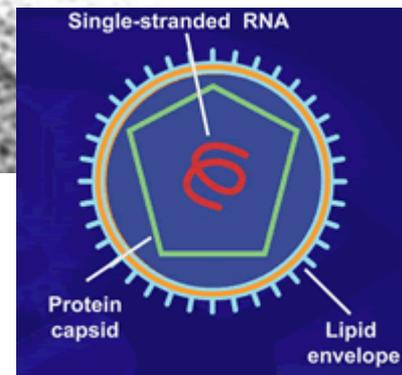
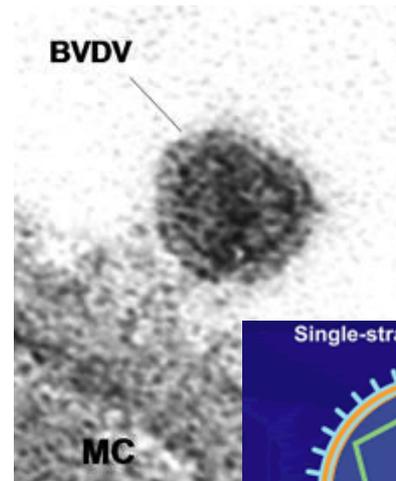
	Primária	Linhagem diplóide	Linhagem Contínua
Origem	Diretamente a partir de tecido fresco	Cultura primária que sobreviveu ao repique	Tumores ou tecido normal (diplóide) transformado in vitro
Morfologia	Morfologia do tecido original	Fibroblastóide	Epitelióide
Cariótipo	Diplóide	Diplóide	Aneuplóide
Vantagens	Mais sensíveis para o cultivo viral, melhor sistema Isolamento de alguns virus e produção de vacinas	Isolamento e propagação de virus Preparo de vacinas	Propagação indefinida in vitro, manutenção por repiques sucessivos: Muito utilizadas no isolamento de vírus para diagnóstico.
Desvantagens	Mais difícil de obter Baixa resistência a repiques caras	Infecção por virus adventício	Não podem ser usadas para o preparo de vacinas Infecção por vírus adventício

# Problemática

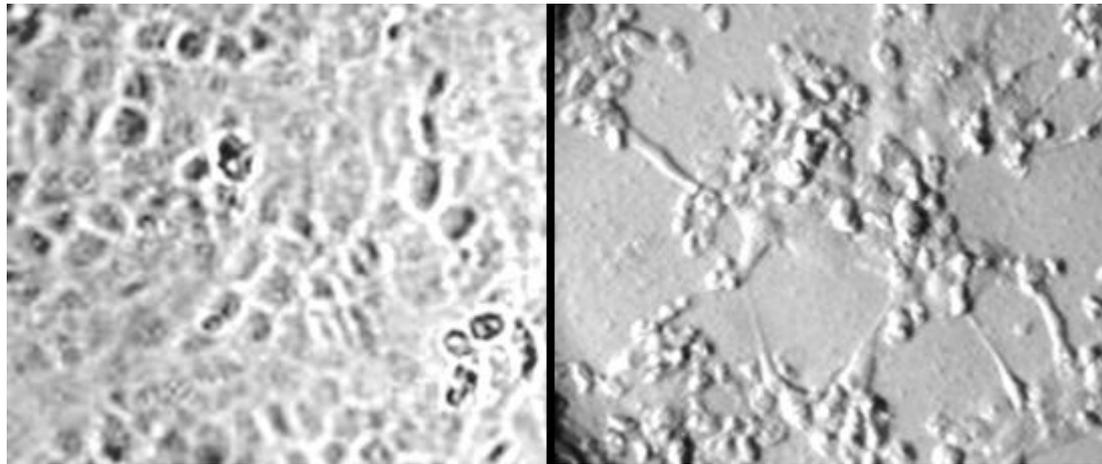
- Lento (até 4 semanas para o resultado)
- Baixa sensibilidade: condição da amostra
- Suscetível à contaminação bacteriana
- Presença de substâncias tóxicas que alteram ou invalidam o resultado da cultura
- Alguns vírus não crescem em cultura celular: hepatite B e C, Parvovírus, Papilloma virus
- Alguns vírus são linhagens-específicos

# Problemática

- Contaminação por vírus adventícios (FROMMER et al., 1993)
- BVDV é considerado o principal contaminante de cultivos celulares (BOLIN et al., 1994; WESSMAN & LEVINGS, 1999; AUDET et al., 2000)
- BVDV amplamente distribuído na população bovina (BAKER, 1995).



- EPIDEMIOLOGIA
- Soro contaminado ou rebanho contaminado?



*células normais (esq.) e células infectadas pelo vírus BVDV (dir.) em imagens de microscópio ótico*

- Uma linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV (CRIB) foi obtida a partir da linhagem universal MDBK.
- Diagnóstico virológico e pesquisa para multiplicação de outros vírus e produção de vacinas.
- A partir do desenvolvimento da CRIB, novas linhagens resistentes foram obtidas a partir das linhagens parentais de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e de coelhos (RK-13).

# Principais tipos celulares utilizados e vírus-alvo

Vírus	Célula
Virus sincicial respiratório	Hep2, Hela
Virus do sarampo	Hep2, Vero
Enterovirus	MA-104, GMK
Rotavirus	MA-104, Vero
Adenovirus	Hela, Hep-2
Virus herpes simples	Hep-2, Vero
Arbovirus	Vero, LLC-MK2

# Cultura celular- diagnóstico viral

Diagnóstico baseado em:

- Efeitos citopáticos
- PCR
- IF

# Efeitos citopáticos

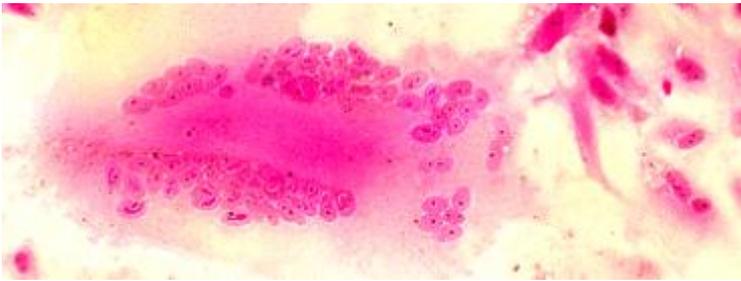
- Degeneração granular: células grandes, refringentes, formando aglomerados em cachos de uva Ex.: Adenovírus.
- Vacuolado: citoplasma com regiões em forma de bolha escamosa.
- Corpúsculos de inclusão: acidófilos ou basófilos. Em geral, a localização e a coloração do corpúsculo são características de determinados grupos de vírus. Ex: Corpúsculo de Negri Vírus da Raiva.

- Picnose nuclear (células pequenas, arredondadas e soltas do tapete) Ex : Picornavírus

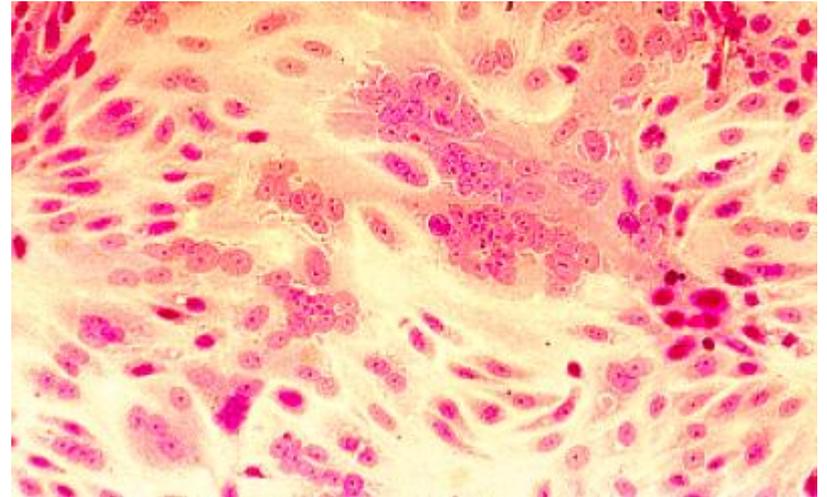


Fig. 1, Cytopathic effects of enterovirus 71 in rhesus monkey kidney cells

- Sincícios ( células gigantes multinucleadas) Ex : Paramixovírus, Herpesvírus



Sarampo



Virus sincicial respiratório

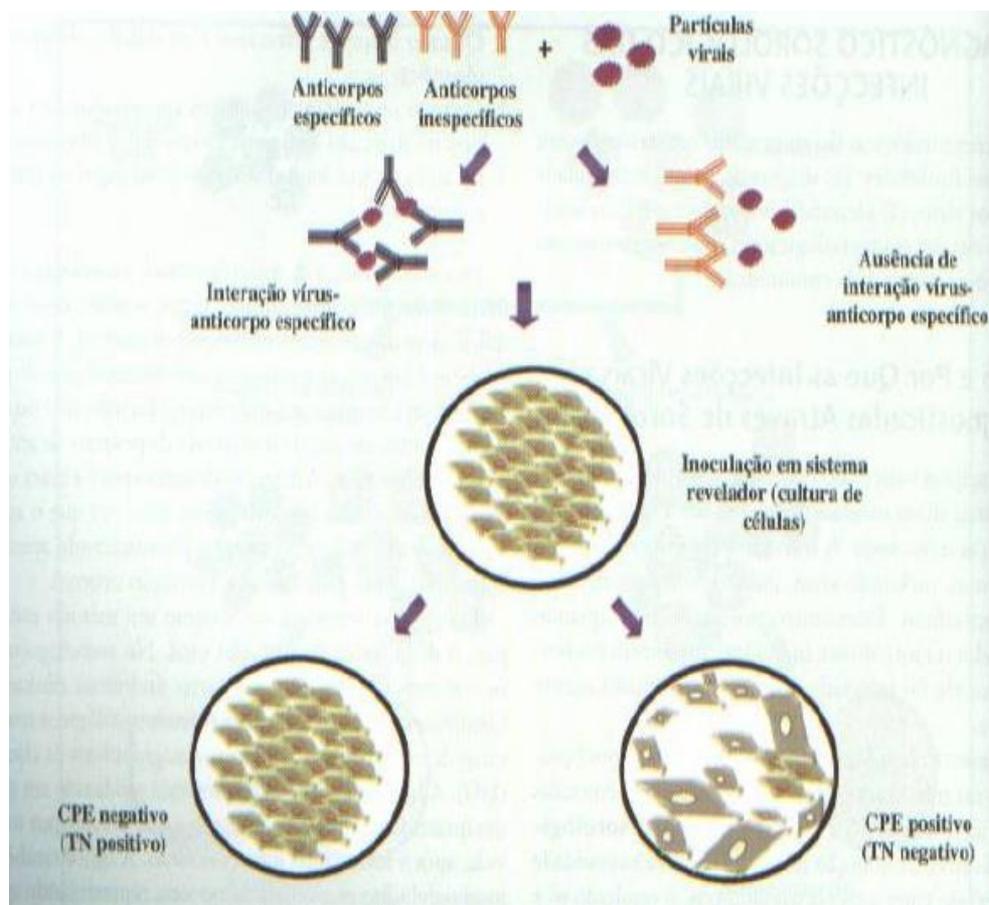
# Confirmação da replicação viral

Sem efeito citopático



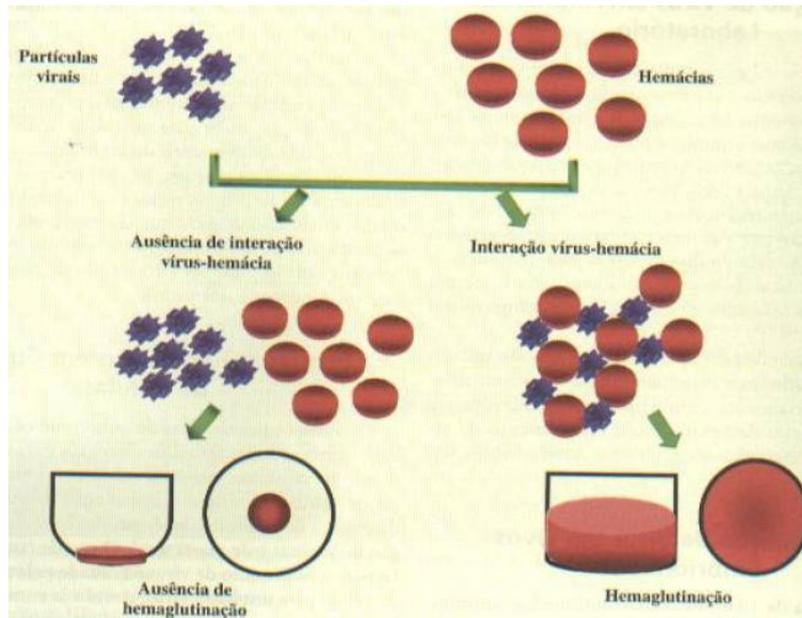
Atividade biológica, antígenos  
ou ácidos nucleicos

# Teste de neutralização



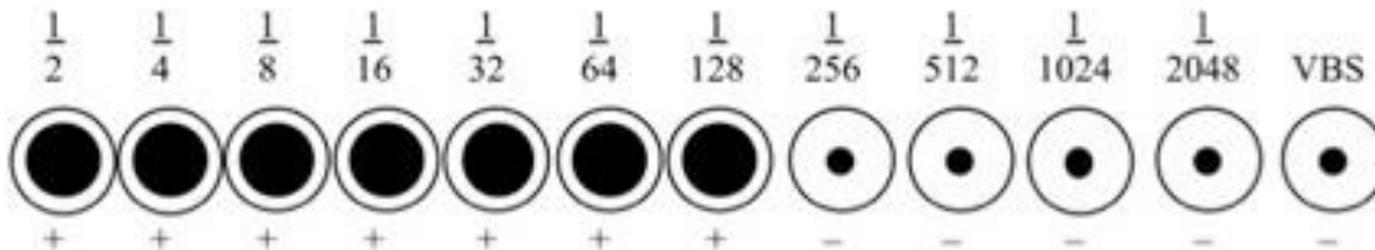
\*Célula permissiva

# Hemaglutinação

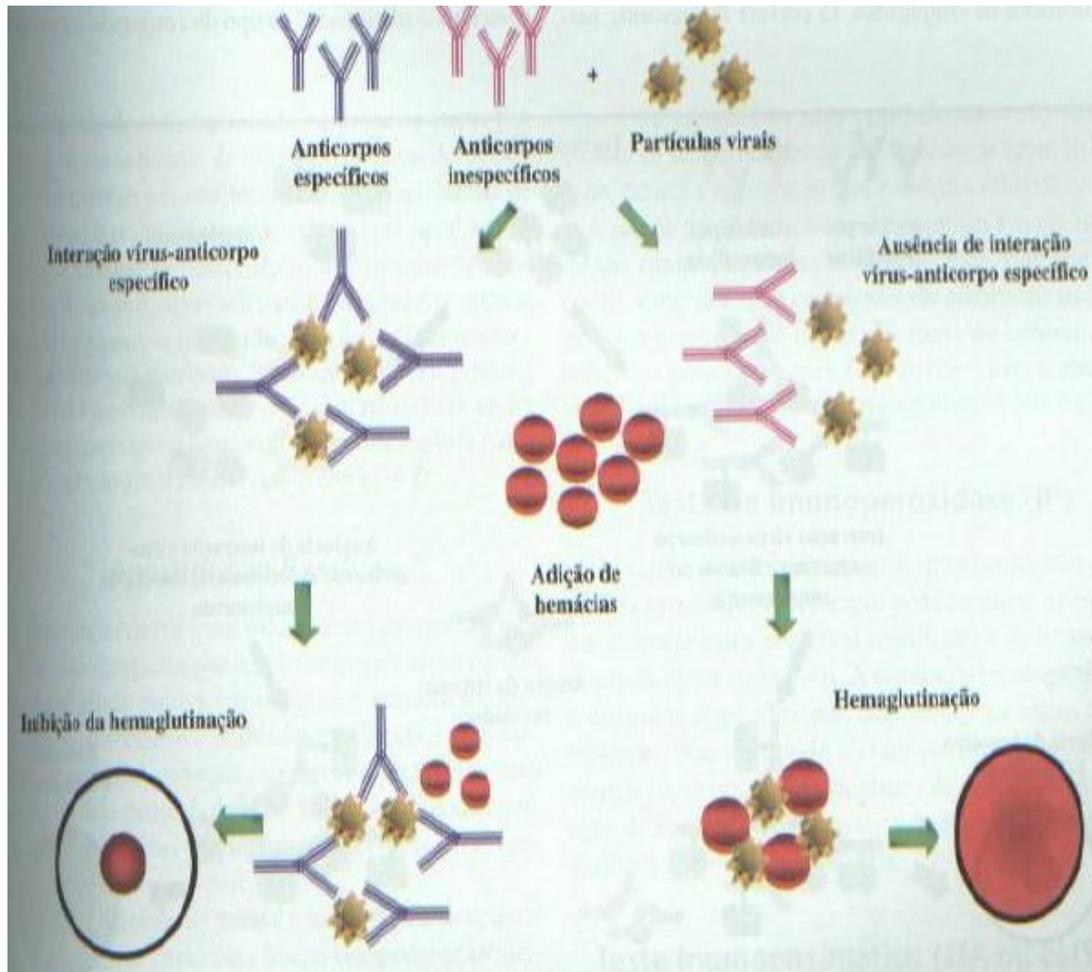


# Hemaglutinação: Quantificação viral

- TITULAÇÃO

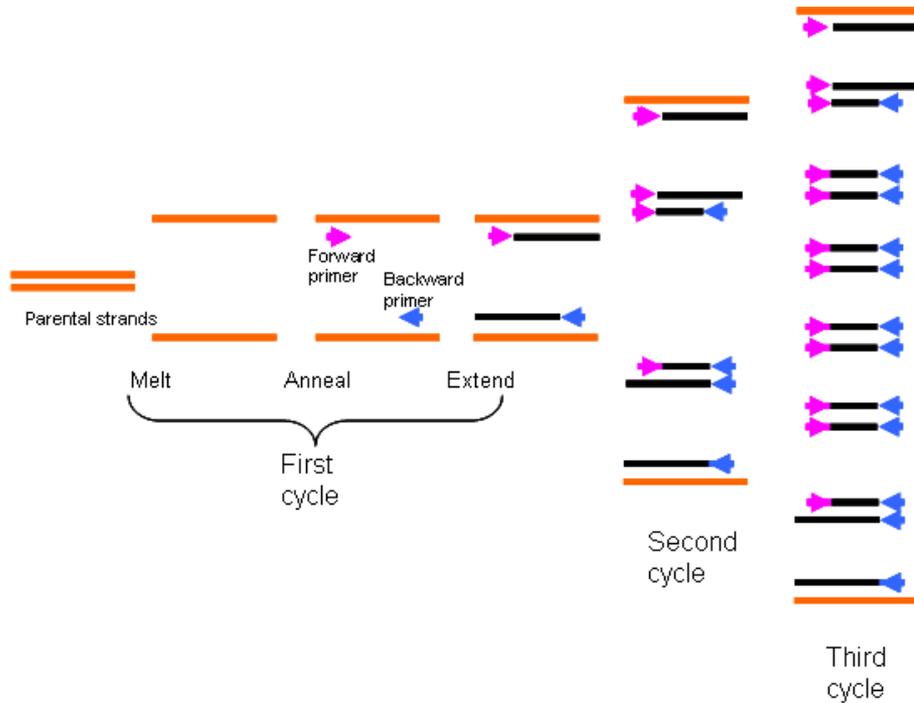


# Inibição de hemaglutinação



- Se há especificidade na interação vírus x anticorpo, não haverá hemaglutinação.

# PCR



Deteccção e identificação:

- Gel de agarose por eletroforese
- Hibridização com sonda específica
- Análise com enzimas de restrição ou sequenciamento

# Imunofluorescência

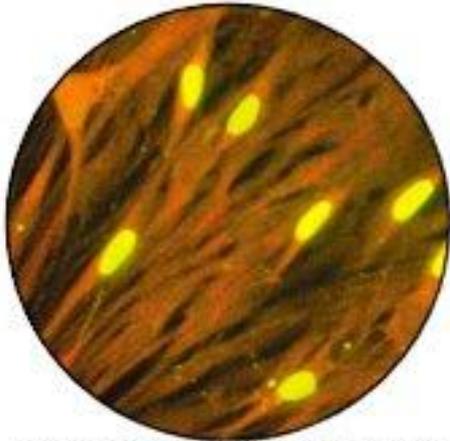


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

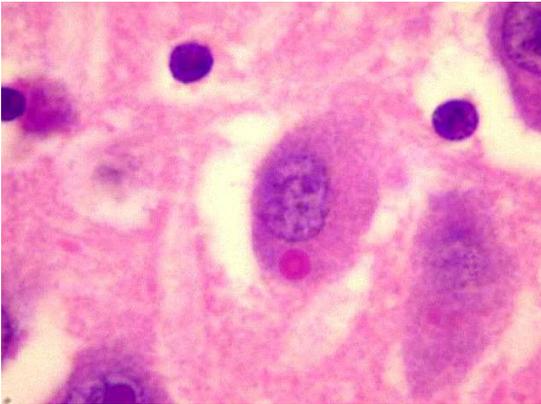
- Variante: Técnica rápida
- Detecção do antígeno viral em 2-4 dias
- Camada celular cresce em lâminas individuais dentro da garrafa de cultura
- Inoculação, centrifugação da garrafa (adsorção viral) e incubação
- Lâmina retirada e IF é realizada

# Progressos no cultivo celular aplicado

# Raiva

- Neurotrópico
- Diagnóstico

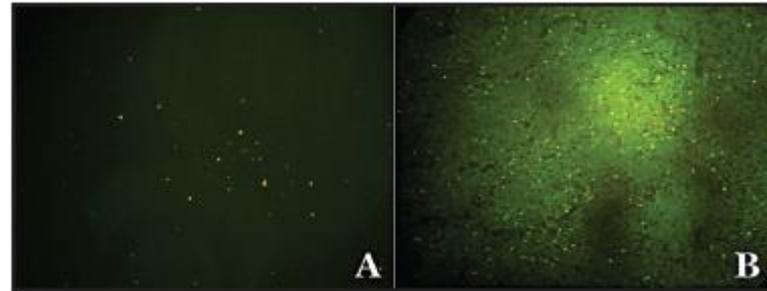
Coloração de Sellers



Inoculação *in vivo*

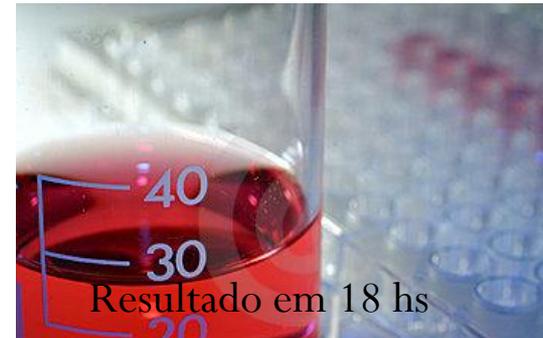


Imunofluorescência direta



Isocianeto de fluoresceína

## Cultivo celular



# Cultivo celular

- Procedimentos
  - Preparo das suspensões do SNC
    - 0,6g de tecido + 2,4mL de diluente/ 1h
    - Centrifugação 30 min a 3000 rpm
    - Sobrenadante

1ml de gentamicina e  
20ml de soro fetal  
bovino, completando o  
preparo com solução  
fisiológica

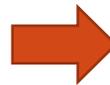


# Cultivo celular

- Procedimentos

- Preparo da cultura de células

- Células de neuroblastoma murino (Neuro 2<sup>a</sup>)
- Ressuspendidas em 10 ml de meio
- $5 \times 10^5$ 
  - 10% de soro fetal bovino, 30 $\mu$ L de antibiótico (gentamicina) e 30 $\mu$ L de aminoácido



# Cultivo celular

- Procedimentos
  - Preparo da placa
    - Em cada 3 orifícios: 40 $\mu$ L da suspensão SNC, 160 $\mu$ L meio de cultura essencial
    - Homogeneização e adicionado 100 $\mu$ L da suspensão celular
    - Encubação: 37°C em câmara úmida; CO<sub>2</sub> a 5% por 96 horas



# Cultivo celular

- Procedimentos
  - Remoção
    - Bomba de sucção
  - Fixação
    - Acetona gelada a 80% - 200uL por orifício/ 15min
    - A acetona deve ser dispensada

# Cultivo celular

- Procedimentos
  - Adição do conjugado
    - 40 $\mu$ L do conjugado anti-rábico por orifício
    - 37°C por 60 minutos
    - Enxágue da placa por submersão, 3 vezes, em solução salina tamponada – pH 7,4
    - Adição de 50 $\mu$ L de glicerina tamponada (pH 8,5) em cada orifício
  - Vizualização por luz ultravioleta

# Progressos

- Relacionados ao aprimoramento de linhagens celulares utilizadas

inicialmente

BHK-21

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 1975, p. 243-245  
Copyright © 1975, American Society for Microbiology

Vol. 1, No. 3  
Printed in U.S.A.

## Sensitivity of BHK-21 Cells Supplemented with Diethylaminoethyl-Dextran for Detection of Street Rabies Virus in Saliva Samples

O. P. LARGHI,\* A. E. NEBEL, L. LAZARO, AND V. L. SAVY  
*Pan American Zoonoses Center, PAHO, WHO Ramos Mejía, Argentina*

Received for publication 4 November 1974

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 1987, p. 1456-1458  
0095-1137/87/081456-03\$02.00/0  
Copyright © 1987, American Society for Microbiology

Vol. 25, No. 8

## Comparison of Sensitivity of BHK-21 and Murine Neuroblastoma Cells in the Isolation of a Street Strain Rabies Virus

ROBERT J. RUDD\* AND CHARLES V. TRIMARCHI  
*Wadsworth Center for Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany, New York 12201*

Received 17 March 1987/Accepted 6 May 1987

Neuro-2a

# Progressos

- Células renais embrionárias humanas
- IF 2.529
- Comparacao

HEK-293

International Journal of Infectious Diseases 14 (2010) e1067–e1071



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijid](http://www.elsevier.com/locate/ijid)



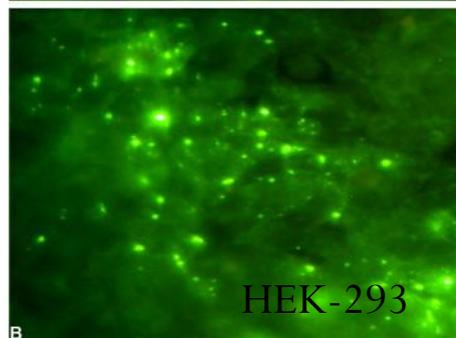
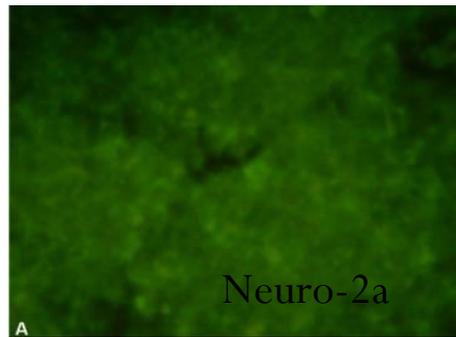
Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines

Shampur Narayan Madhusudana \*, Subha Sundaramoorthy, Padinjarematthil Thankappan Ullas

*Department of Neurovirology, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Rabies, National Institute of Mental Health and Neurosciences (NIMHANS), Hosur Road, Bangalore, India*

# Progressos

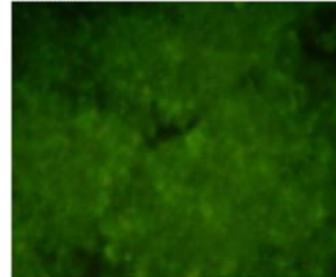
## Infecção por CVS



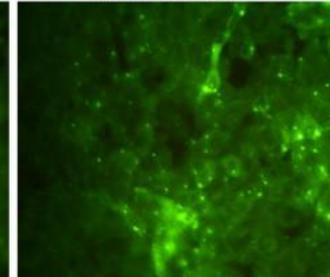
BHK-21 não foi infectada

## Infecção pelo vírus da raiva

NEGATIVE CONTROL  
HEK-293

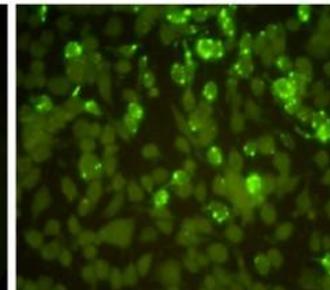
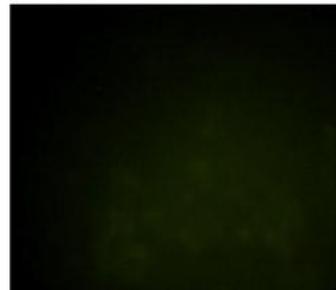


INFECTED WITH  
STREET VIRUS



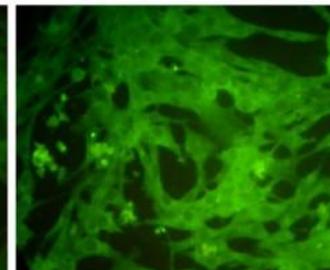
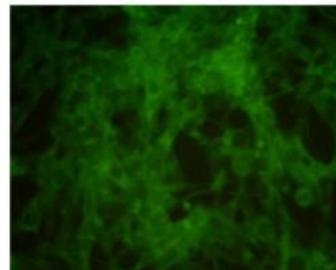
++++

Neuro 2a



++++

BHK-21



++

# Rubéola

- Sem diagnóstico clínico
- Ausência de efeitos citopatológicos
- Confirmação

Cultivo celular + PCR

# Rubéola

- Tem se desenvolvido trabalhos que avaliam essa tecnica
- Nova tecnica para confirmação do isolamento e genotipagem

Journal of Medical Virology 83:170-177 (2011)

## Application of New Assays for Rapid Confirmation and Genotyping of Isolates of Rubella Virus

Yan Feng,<sup>1,2</sup> Sabine Santibanez,<sup>3</sup> Hazel Appleton,<sup>2</sup> Yiyu Lu,<sup>1\*</sup> and Li Jin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Centre for Disease Control and Prevention of Zhejiang Province, Institute of Viral Diseases, Hangzhou, China

<sup>2</sup>Virus Reference Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, London, United Kingdom

<sup>3</sup>Department of Viral Infections, National Reference Centre for Measles, Mumps and Rubella, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany

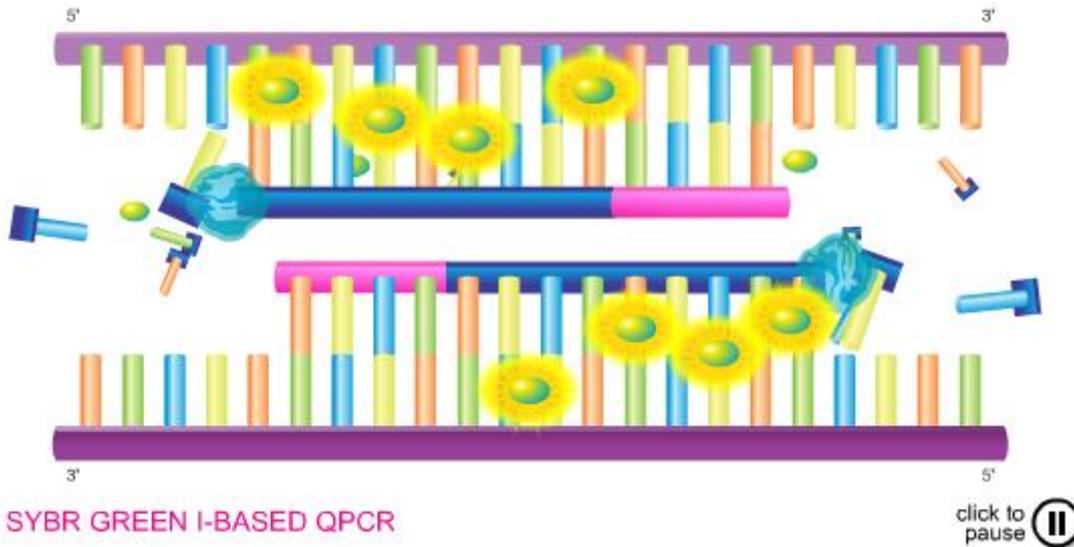
IF 2.232

- Cultivo celular
  - Células vero
  - Protocolo

# Progresso

## Cultivo celular + PCR

SYBR Green I-based real-time PCR assay



Para a confirmação do isolamento

- Nested-PCR

Para a genotipagem do vírus

# Conclusões

- Cultivo celular é considerado padrão para isolamento e diagnóstico viral, devendo ser aliado a outras técnicas, como análise por microscopia, PCR, imunofluorescência, etc.
- Linhagens celulares resistentes a determinadas viroses aumenta a confiabilidade dos testes
- Há necessidade de encontrar linhagens suscetíveis e protocolos para isolar e propagar vírus atualmente não cultiváveis
- As boas práticas de laboratório são essenciais

# Referências

- **Application of new assays for rapid confirmation and genotyping of isolates of Rubella virus** Yan Feng, Sabine, Santibanez, Hazel Appleton, Yiyu Lu, Li Jin
- **Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines** Madhusudana SN, Sundaramoorthy S, Ullas PT
- **Sensitivity of BHK-21 Cells Supplemented with Diethylaminoethyl-Dextran for Detection of Street Rabies Virus in Saliva Samples** P. LARGHI, A. E. NEBEL, L. LAZARO, AND V. L. SAVY
- **Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus.** Rudd RJ, Trimarchi CV
- <http://planetasustentavel.abril.com.br/blog/biodiversa/page/14/>
- <http://www.virology-online.com/general/Tests.htm#Overview>
- <http://www.viomed.com/services/product/profs.htm>
- *Virologia Veterinária* (2007) E.F. Flores (org)
- *A Concise Review of Veterinary Virology*, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)), Last updated: 6-Dec-2004
- *Microbiologia*. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case. 8. Ed, Editora Artmed.

• Obrigado!