



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS DE CURITIBANOS

CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

COORDENADORIA ESPECIAL DE BIOCÊNCIAS E SAÚDE ÚNICA

Sarah Maria van Tol Amaral Guerra

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO NA ÁREA DE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS
INFECCIOSAS E VIROLOGIA**

Curitibanos

2022

Sarah Maria van Tol Amaral Guerra

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO NA ÁREA DE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS
INFECCIOSAS E VIROLOGIA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Arenhart.

Curitibanos

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Guerra, Sarah Maria van Tol Amaral Guerra
RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO NA ÁREA
DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS
INFECCIOSAS E VIROLOGIA / Sarah Maria van Tol
Amaral Guerra Guerra ; orientador, Sandra Arenhart
Arenhart, 2022.

38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2022.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. Medicina veterinária
preventiva. 3. Setor de virologia. 4. Universidade Federal
de Santa Maria. 5. Diagnóstico laboratorial. I. Arenhart,
Sandra Arenhart. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

Sarah Maria van Tol Amaral Guerra

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO NA ÁREA DE
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA COM ÊNFASE EM DOENÇAS
INFECCIOSAS E VIROLOGIA**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Curitiba, 19 de dezembro de 2022.

Prof. Malcon Andrei Martinez Pereira, Dr.

Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Profª Drª Sandra Arenhart - UFSC

Profª Drª Viviane Glaser - UFSC

Prof Dr Álvaro Menin - UFSC

Para minha mãe, por ser fundamentalmente a motivação de
tudo que faço nesta vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiríssimo lugar agradeço à minha mãe por ser meu compasso moral e fonte inesgotável de amor e compreensão, mesmo distantes fisicamente nunca estive só.

Agradeço ao meu pai, por sempre acreditar na minha capacidade intelectual e me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço imensamente aos meus irmãos, Matheus, por ser alegria e resiliência acima de todas as coisas, Pedro, por ser meu melhor amigo, nunca julgar minhas ideias e sempre melhorar meu dia e João, por ser absolutamente autêntico e o ser humano mais dedicado em tudo o que faz. Tenho orgulho e amor infinitos pelos três.

Agradeço às minhas grandes amigas Theopi, Emily e Talita, poucas são as pessoas que tem a sorte de encontrar amizades preciosas assim. Vocês me inspiram a nunca desistir e não ter medo das dificuldades.

Obrigada também, aos amigos feitos durante a graduação: Jéssica, Jaqueline, William, Thaísa, Maria Eduarda, Marcos Paulo, Fernando, Larissa, Andressa, Heloísa, esses cinco anos foram inesquecíveis, vou sempre torcer pelo sucesso pessoal e profissional de cada um.

Agradeço à Professora Dr^a Viviane Glaser, por ser a primeira a acreditar no meu potencial e me convidar para trabalharmos juntas no Laboratório de Biologia Celular como aluna de iniciação científica. Esta oportunidade específica foi fundamental para o desenvolvimento da minha autoconfiança e à paixão por aprender e questionar.

Agradeço à Professora Dr^a Sandra Arenhart, por me acolher, sempre responder as minhas infinitas perguntas acerca da virologia veterinária e por me ajudar com tudo que estivesse ao seu alcance nos meus últimos semestres de graduação.

Em relação ao estágio curricular no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria, devo agradecer primeiramente aos grandes mestres Professor Dr. Eduardo Flores e Professor Dr. Rudi Weiblen, por serem profissionais admiráveis e por tornarem essa oportunidade possível. Aos colegas estagiários, obrigada por serem exatamente como são, engraçados, incansáveis e unidos, vocês tornaram meus dias

mais felizes. Agradeço também à equipe de pós-graduação, por serem acessíveis e sempre muito solícitos nas diversas vezes em que os busquei procurando por auxílio.

Agradeço também à Universidade Federal de Santa Maria e à Universidade Federal de Santa Catarina, instituições as quais tenho orgulho de ter sido aluna e estagiária.

“Sempre acreditei, e ainda acredito, que qualquer que seja a sorte que surja em nosso caminho, boa ou má, sempre podemos dar-lhe significado e transformá-la em algo de valor.”

(Hermann Hesse)

RESUMO

Este relatório de estágio curricular supervisionado irá abordar as atividades realizadas e/ou acompanhadas no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria durante o período de 08 de agosto à 30 de novembro, sob supervisão do Professor Dr. Eduardo Flores e orientação da Professora Dr^a Sandra Arenhart. Tem como objetivo descrever a estrutura física do laboratório e demais salas que atendem ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, os métodos diagnósticos empregados e a casuística de exames realizados durante este período. Foi possível o acompanhamento e/ou realização de técnicas envolvendo virologia clássica e biologia molecular, tais quais congelamento, descongelamento, passagens e cultivo de células, extração e purificação de amostras de DNA e RNA, produção de vacinas contra papilomatose bovina e canina, ensaios de imunofluorescência, isolamento em cultivo celular e amplificação viral, ensaios ELISA, PCR e imunodifusão em gel de ágar.

Palavras-chave: Virologia, Diagnóstico, Medicina Veterinária, Estágio Curricular Obrigatório.

ABSTRACT

This supervised curricular internship report will address the activities carried out and/or monitored in the Virology Sector of the Federal University of Santa Maria during the period from August 8 to November 30, under the supervision of Professor Dr. Eduardo Flores and guidance of Professor Dr. Sandra Arenhart. It aims to describe the physical structure of the laboratory and other rooms that serve the Department of Preventive Veterinary Medicine, the diagnostic methods used and the series of tests performed during this period. It was possible to monitor and/or perform techniques involving classical virology and molecular biology, such as freezing, thawing, passages and culture of cell, extraction and purification of DNA and RNA samples, production of vaccines against bovine and canine papillomatosis, immunofluorescence, viral isolation and amplification, ELISA assays, PCR and agar gel immunodiffusion.

Keywords: Virology, Diagnosis, Veterinary Medicine, Mandatory Curricular Internship.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fachada do Setor de Virologia.....	14
Figura 2. Recepção do Setor de Virologia.....	16
Figura 3. Entrada do Setor de Virologia.....	16
Figura 4. Sala de lavagens e esterilização do Setor de Virologia.....	17
Figura 5. Sala de diagnóstico do Setor de Virologia.....	18
Figura 6. Sala de mix/ Sala de preparos de meios do Setor de Virologia.....	18
Figura 7. Sala de microscópios e estufas para cultivo celular do Setor de Virologia.....	19
Figura 8. Sala de cultivo celular do Setor de Virologia.....	19
Figura 9. Sala de cultivo viral do Setor de Virologia.....	20
Figura 10. Sala de imunofluorescência e imunocitoquímica do Setor de Virologia.....	21
Figura 11. Sala de biossegurança do Setor de Virologia.....	21
Figura 12. Sala de biologia molecular do Setor de Virologia.....	22
Figura 13. Sala de equipamentos do Setor de Virologia.....	23
Figura 14. Sala escura / Microscópio de imunofluorescência do Setor de Virologia.....	23
Figura 15. Mapas de risco do Setor de Virologia.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Técnicas diagnósticas realizadas e acompanhadas durante estágio..... 25

Tabela 2. Características das linhagens celulares utilizadas no Setor de Virologia..28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK-21 - *Baby Hamster Kidney fibroblasts – 21 days*

BLV - *Bovine leukemia virus* (vírus da leucose enzoótica bovina)

BVDV - *Bovine viral diarrhea virus* (vírus da diarreia viral bovina)

cDNA - DNA complementar

CO₂ - Dióxido de carbono

CRFK - *Crandell Rees Cat Kidney*

CRIB - *Cells Resistant to Infection with BVDV-1*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoadsorção enzimática

g - Grama

HRT-18 - *Human Rectal Tumor - 18 days*

IFA - Imunofluorescência

IPX - Imunoperoxidase

MDBK - *Madin-Darbin Bovine Kidney*

MEM - Meio essencial mínimo

mg - Miligrama

mL - Mililitro

nm - Nanômetro

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

PI - Persistentemente infectado

RNA - Ácido ribonucleico

rpm - Rotação por minuto

RPMI - Meio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*

SV - Setor de Virologia

TE - Tris-EDTA

UFMS - Universidade Federal de Santa Maria

uL - Microlitro

UV - Ultravioleta

VERO - *African Green Monkey Kidney Cells*

VERO SLAM - *African Green Monkey Kidney Cells with SLAM receptors*

°C - Graus Celsius

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
2. Descrição do local de estágio.....	14
2.1 Funcionamento do local	15
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	24
3.1. Cultivo e passagem celular	25
3.2. Congelamento celular	26
3.3. Descongelação celular.....	27
3.4. Produção de vacinas autógenas contra papilomatose bovina e canina.....	28
3.5. ELISA.....	29
3.6. Extração de material genético.....	30
3.6.1 DNA.....	30
3.6.2 RNA.....	31
3.7. Imunofluorescência	31
3.8. PCR.....	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS	34

INTRODUÇÃO

O estágio curricular obrigatório ocorre durante a décima fase do curso de Medicina Veterinária e possibilita que o estudante adquira experiência profissional dentro da área de atuação escolhida ao acompanhar profissionais no seu âmbito de trabalho. O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas no Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria durante o período de 08 de agosto à 30 de novembro de 2022, sob supervisão do professor Dr. Eduardo Flores e orientação da professora Dr^a. Sandra Arenhart.

As atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas no Setor de Virologia durante o estágio curricular supervisionado envolveram técnicas de virologia clássica e biologia molecular, tais quais, congelamento, descongelamento, passagens e cultivo de células, extração e purificação de amostras de DNA e RNA, produção de vacinas contra papilomatose bovina e canina, ensaios de imunofluorescência, isolamento e amplificação viral, ensaios ELISA, soroneutralização, PCR, RT-PCR e imunodifusão em gel de ágar. Também foi permitido a participação nas aulas ministradas para alunos da pós-graduação Doenças Exóticas, *Research in Seminars II* e reuniões semanais com alunos e professores da pós-graduação.

A virologia veterinária foi a área de atuação escolhida para estágio, pois, apresenta papel importante dentro da Medicina Veterinária Preventiva e gera grande impacto na clínica médica de grandes e pequenos animais. Os estudos dentro da Medicina Veterinária Preventiva e da virologia visam, junto com a epidemiologia, prevenir e diminuir casos de doenças infecciosas emergentes e reemergentes com ênfase na promoção da saúde pública. Atualmente, também faz parte do conceito de Saúde Única, pois este diz respeito à medicina humana, medicina veterinária e saúde do meio ambiente (Miranda, 2018).

Devido a isto, a relação humano-animal e a transmissão de doenças virais com potencial zoonótico exigem constantes estudos para possibilitar a diminuição de possíveis novos casos de doenças infecciosas e um melhor entendimento entre a susceptibilidade de diferentes espécies aos agentes patogênicos virais (Overgaauw *et*

al., 2020). Além disso, há também o aspecto econômico que repercute na produção de grandes animais, acometendo rebanhos e levando a perdas significativas na agroindústria brasileira.

A área escolhida para realização do estágio curricular supervisionado foi a medicina veterinária preventiva, com ênfase em doenças infecciosas e virologia. Tal área é importante para a manutenção da saúde como um todo e seus estudos permitem a prevenção de novos casos de pandemias, zoonoses, criam novos tratamentos e suas técnicas permitem diagnosticar doenças infecciosas (Maclachlan, 2011).

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi realizado totalmente no Setor de Virologia (SV, Figura 1) da Universidade Federal de Santa Maria, localizado no bairro Camobi, Avenida Roraima 1000, prédio 63A. O laboratório foi fundado em 1983 e está vinculado ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva juntamente com os laboratórios de bacteriologia e parasitologia.

Figura 1. Fachada do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

O Setor de Virologia realiza diagnósticos de doenças víricas de pequenos e grandes animais, produz vacinas autógenas contra papilomatose bovina e canina e,

também, realiza pesquisas científicas, possuindo bolsistas de doutorado, mestrado e iniciação científica.

O prédio 63A, onde está localizado o SV, apresenta três andares. No primeiro andar há a recepção, local de entrada ao laboratório, sala de diagnóstico, sala de lavagens e esterilização, sala de estudantes, almoxarifado, sala para preparo de *mix* para PCR, sala de preparo de meios de cultivo, sala de freezers, sala de microscópios e estufas para cultivo celular, sala para cultivo celular, sala para cultivo viral, sala para imunofluorescência, sala de biossegurança para diagnóstico de raiva, sala escura e sala de biologia molecular. O segundo andar compreende cozinha, refeitório, sala de estudantes da pós-graduação, biblioteca e sala dos professores Dr. Rudi Weiblen e Dr. Eduardo Flores. O terceiro andar conta com anfiteatro, biotério e almoxarifados. Dentre os equipamentos encontrados no laboratório podemos citar centrífugas, centrífuga refrigerada, banhos-maria, câmaras de fluxo, pHmetro, espectrofotômetro, espectrofômetro nanodrop, lavadora de microplacas, estufas com e sem CO₂, estufas para secagem de vidrarias, forno, autoclaves, destiladores, agitadores, máquina para produção de gelo, lavador de pipetas, geladeiras, freezers a -80°C e -20°C, botijões de nitrogênio líquido, microscópios ópticos de inversão, microscópio de imunofluorescência, balança de precisão, micro-ondas, termoblocos, termocicladores, cubas para eletroforese e transiluminador UV.

2.1 Funcionamento do local

O Setor de Virologia funciona de segunda à sexta das 08:00 às 17:30. As amostras são entregues na recepção (Figura 2) pessoalmente, ou através de entrega por correios ou transportadora, e são registradas no sistema com sigla específica, armazenadas previamente em geladeira para posterior processamento e diagnóstico.

Figura 2. Recepção do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

Lateralmente à recepção há uma área própria para que os funcionários, estagiários e estudantes coloquem jalecos e troquem os sapatos para que haja manutenção da biossegurança (Figura 3).

Figura 3. Entrada do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

O responsável pela técnica diagnóstica deve observar no quadro de pedidos de exames se há novas amostras e, caso seja necessário, deve realizar a preparação de acordo com o diagnóstico. Esse preparo pode envolver centrifugação para coleta de

soro sanguíneo, inativação de soro, maceração e incubação de fragmentos de pele, extração de material genético proveniente de diversos tipos de amostra. A maior parte dos exames de rotina que são realizados no Setor de Virologia são ensaios ELISA, soroneutralização, isolamento em cultivo celular, PCR, RT-PCR, imunofluorescência, imunoperoxidase e produção de vacinas autógenas. A equipe atual do Setor de Virologia é formada por duas doutorandas, quatro mestrandas, seis estagiários e dois professores. No laboratório há uma sala própria para lavagens e esterilização de vidrarias e materiais utilizados nas técnicas de diagnóstico (Figura 4).

Figura 4. Sala de lavagens e esterilização do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

As diferentes técnicas laboratoriais são realizadas em locais diferentes dentro do Setor de Virologia. A sala de diagnóstico (Figura 5) apresenta local próprio para recebimento das amostras através de janela conectada à recepção, extração e mensuração de material genético e ensaios ELISA.

Figura 5. Sala de diagnóstico do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

Para a realização da técnica de PCR é necessário que seja elaborado misturas (mix) específicos para permitir a amplificação de cada alvo genético. Esta mistura não pode apresentar presença de outros materiais genéticos e por isso, é feita em ambiente com níveis menores de contaminação (Figura 6). A sala lateral à sala de mix é onde são produzidos os meios de cultivo utilizados no laboratório.

Figura 6. Sala de mix/ Sala de preparo de meios do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

O laboratório também conta com um ambiente com microscópios de inversão (Figura 7) para análise das técnicas de soroneutralização, cultivo celular, isolamento

viral, imunofluorescência, entre outras. A mesma sala contém ao fundo estufas para cultivo celular com e sem CO₂.

Figura 7. Sala de microscópios e estufas para cultivo celular do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

As técnicas de soroneutralização, imunofluorescência, isolamento em cultivo celular, amplificação viral, PCR e as pesquisas dos alunos de pós-graduação são realizadas, em sua maioria, com células cultivadas em garrafas. Para a manutenção e passagem destas células há uma sala de cultivo celular (Figura 8) com câmaras de fluxo, banho-maria, geladeira e centrífuga.

Figura 8. Sala de cultivo celular do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

As técnicas de isolamento em cultivo celular, soroneutralização, imunofluorescência e os projetos de pesquisa conduzidas no Setor de Virologia utilizam partículas víricas infectantes. Para permitir a biossegurança e diminuir contaminação com outros ambientes, o trabalho feito com vírus é feito em câmaras de fluxo exclusivas e localizadas em sala de cultivo viral (Figura 9).

Figura 9. Sala de cultivo viral do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

As técnicas de imunofluorescência (IFA), imunoperoxidase (IPX) e produção de vacinas contra papilomatose bovina e canina são feitas em ambiente próprio (Figura 10) localizado próximo à sala de microscópios e estufas para cultivo celular. A proximidade entre os ambientes é devido à necessidade de utilização de células saudáveis para a realização de IFA e IPX.

Figura 10. Sala de imunofluorescência e imunoperoxidase do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

O diagnóstico da raiva é realizado em sala própria e dispõe de materiais exclusivos para o manejo das amostras biológicas e confecção da técnica. A sala de biossegurança (Figura 11) possui freezer para manutenção dos controles positivos, câmara de fluxo, bancada e todo o material necessário para que não haja contaminação da pessoa responsável pela realização da técnica e nem do ambiente.

Figura 11. Sala de biossegurança do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

A maior parte das pesquisas realizadas pelos alunos de pós-graduação e a técnica de PCR envolvem biologia molecular e o laboratório consta com uma sala

própria para este fim, com quatro termocicladores, transiluminador UV, cubas para eletroforese e equipamentos de precisão. A sala de biologia molecular (Figura 12) possui conexão direta com a sala de mix para possibilitar maior precisão e menor contaminação na realização das técnicas.

Figura 12. Sala de biologia molecular do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

O Setor de Virologia necessita de freezers com capacidade para -80°C e -20°C para congelamento de reagentes, amostras biológicas, vírus, vacinas produzidas contra papilomatose bovina e canina. A sala de equipamentos (Figura 13) também possui geladeira onde é armazenado vacinas que estão sendo processadas e *kits* para diagnóstico ELISA.

Figura 13. Sala de equipamentos do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

Para a realização do diagnóstico realizado através da técnica de IFA é necessário um ambiente escuro com controle da entrada de luminosidade e um microscópio de imunofluorescência. No laboratório, a sala escura (Figura 14) é localizada próximo à sala de biossegurança e de microscópios.

Figura 14. Sala escura/ Microscópio de imunofluorescência do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

O Setor de Virologia mantém exposto os mapas de risco (Figura 15) referentes a cada andar do laboratório. O desenho esquemático indica a graduação de risco e o tipo de acidente que as pessoas estão possivelmente envolvidas em cada sala.

Figura 15. Mapas de risco do Setor de Virologia.



Fonte: Guerra, 2022.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O estágio desenvolvido no Setor de Virologia da UFSM envolveu a realização de ensaios ELISA, produção de vacinas contra papilomatose bovina e canina, manutenção de cultivo celular, congelamento e descongelamento celular, e imunodifusão em gel de ágar. Foi realizado, também, o acompanhamento das técnicas de soroneutralização,

isolamento em cultivo celular, amplificação viral, PCR, RT-PCR, extração e purificação de amostras de DNA e RNA, ensaios de imunofluorescência. O número total de ensaios ELISA, vacinas contra papilomatose, soroneutralização, PCR e imunofluorescência para diagnóstico de raiva e seus respectivos percentuais em relação ao número total de técnicas diagnósticas efetuadas durante o período de estágio está demonstrado na Tabela 1. As outras técnicas diagnósticas realizadas no Setor de Virologia que não constam nas tabelas não foram realizadas durante o período de estágio. Os ensaios ELISA e as vacinas contra papilomatose bovina e canina foram de autoria própria, enquanto soroneutralização, PCR e o diagnóstico da raiva foram realizados por outros funcionários.

Tabela 1. Técnicas diagnósticas realizadas e acompanhadas durante estágio.

Técnica	ELISA*		Vacina contra papilomatose*		Soroneutralização			PCR		Imunofluorescência para diagnóstico da raiva			
	BVDV	Leucose	Canino	Bovino	IBR	BVDV-1	BVDV-2	RNA	DNA	Bovino	Equino	Felino	Morcego
Pedidos	58	186	2	61	240	244	16	23	1	4	2	1	3
% Tipo	6,89	22,11	0,23	7,25	28,53	29,01	1,9	2,73	0,11	0,47	0,23	0,11	0,35
% Técnica	29,01		7,49		59,45			2,85		1,18			
Total	841												

Fonte: Guerra, 2022.

ELISA: ensaio de imunoadsorção enzimática; PCR: reação em cadeia da polimerase; BVDV: vírus da diarreia viral bovina; IBR: rinotraqueíte infecciosa bovina; BVDV-1: vírus da diarreia viral bovina tipo 1; BVDV-2: vírus da diarreia viral bovina tipo 2; RNA: ácido ribonucleico; DNA: ácido desoxirribonucleico. *Ensaio ELISA e vacinas contra papilomatose realizados por autora.

3.1 Cultivo e passagem celular

O cultivo celular é necessário para o desenvolvimento de diversas técnicas de diagnóstico para doenças víricas e também era necessário para o desenvolvimento da pesquisa dos alunos de pós-graduação. As células de linhagem contínuas mais utilizadas no Setor de Virologia são do tipo MDBK, VERO, VERO SLAM, BHK-21, CRIB, CRFK e HRT-18. A manutenção destas células é feita de forma diária em

garrafas próprias para o cultivo celular T25, T75 e T150, com capacidade para 25mL, 75mL e 150mL de meio de cultivo, respectivamente. Também era preciso checar o tapete celular pelo menos uma vez ao dia para constatar a correta distribuição de células e sua fixação nessas garrafas.

As mesmas exigem constante manutenção e passagens, sendo que o primeiro passo para a passagem de células é o aquecimento do meio de cultivo, do soro fetal bovino e da tripsina em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Durante esse tempo, deve ser deixada ligada a luz UV (ultravioleta) na câmara de fluxo que será utilizada para manipulação e realização do protocolo. Após decorrido tempo suficiente, em câmara de fluxo deve ser aberta a garrafa de cultivo celular respectiva e retirado o meio de cultivo com o auxílio de pipetador e pipetas de vidro, acrescentado tripsina para lavagem do resquício remanescente de soro fetal bovino que permanece no tapete celular e inativa a tripsina, retirado mais uma vez e acrescentado tripsina novamente em volume idêntico. Para ocorrer a tripsinização é necessário que a garrafa de cultivo seja colocada em estufa a 37°C por aproximadamente 5 min, ocorrendo assim o descolamento do tapete celular do fundo da garrafa e permitindo a individualização das células. As quantidades utilizadas para cultivo celular na maior parte das vezes é 0,3 mL de células, 0,5 mL de soro fetal bovino e 4,2 mL de meio essencial mínimo (MEM), *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) ou meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) para garrafas de cultivo T25, ou 1 mL de células, 1 mL de soro fetal bovino e 8 mL de meio de cultivo MEM, DMEM ou RPMI para garrafas de cultivo T75. A manutenção celular feita através da técnica das passagens permite a utilização dos tapetes celulares em diversas técnicas para diagnóstico feitas no laboratório, tais quais, soroneutralização, isolamento em cultivo celular, imunofluorescência, amplificação viral e PCR.

3.2 Congelamento celular

O congelamento de células permite o estoque de células em botijões de nitrogênio líquido e armazenamento por longos períodos, mantendo a capacidade proliferativa e preservando a viabilidade celular (Martins, 2005). No Setor de Virologia,

ocorria o congelamento celular sempre que havia excedente de células e estas não eram de uso tão comum, o qual ocorria por volta de uma vez na semana. Células MDBK não eram congeladas de forma rotineira, pois diversos pós-graduandos mantinham esse tipo celular vivo em cultivo, porém, células BHK-21 não eram muito utilizadas e sempre mantinha-se algumas alíquotas congeladas para caso houvesse alguma contaminação ou morte celular.

Para realizar o congelamento de um cultivo de células deve ser realizado a tripsinização para permitir que a monocamada de células ao fundo das garrafas se solte e as células sejam individualizadas. Após retirada do tapete celular do fundo da garrafa usando pipetador e pipetas de vidro de 1 ou 2 mL, deve ser realizado a ressuspensão e individualização das células. Para isso, as células são transferidas para um tubo Falcon de 15 mL centrifuga-se por 3 minutos, retira-se o sobrenadante e acrescenta-se 40% de meio de cultivo, 50% de soro fetal bovino, 10% DMSO e ressuspende-se mais uma vez, tomando o devido cuidado para não haver produção excessiva de bolhas.

O armazenamento deve ser feito em criotubos devidamente identificados com o número de registro da amostra. Anteriormente ao congelamento em botijão de nitrogênio líquido, deve-se permitir o resfriamento gradual dos criotubos em geladeira por uma hora, passado esse tempo, os criotubos devem ser transferidos para freezer à -80°C por uma noite e depois podem ser armazenados em botijão de nitrogênio líquido.

3.3 Descongelamento celular

O descongelamento celular é realizado quando há necessidade de uso de algum tipo específico de células para realização de alguma técnica. Cada linhagem celular tem características diferentes e as particularidades influenciam na escolha de uso. Em geral, o descongelamento ocorria em torno de uma vez na semana. Esse processo deve iniciar com a localização no sistema da posição exata do criotubo contendo o tipo celular desejado dentro do botijão de nitrogênio líquido. Após ter em mãos o criotubo, deve ser feito um rápido descongelamento em banho maria à 37°C , e em seguida centrifugação à 3000 rpm por três minutos para ser possível a formação do pellet de

células no fundo do falcon. Retira-se cuidadosamente o sobrenadante e completa-se com meio de cultivo e soro fetal bovino para permitir a ressuspensão. Com o pellet de células ressuspendido, pode ser feita a transferência para uma garrafa de cultivo celular T25.

Tabela 2. Características das linhagens celulares utilizadas no Setor de Virologia.

Linhagem celular	Características	Origem	Meio de cultivo	Morfologia
MDBK	<i>Madin-Darbin Bovine Kidney</i>	Rim bovino	MEM	Células epiteliais
VERO	<i>African Green Monkey Kidney Cells</i>	Rim de macaco verde africano	RPMI	Células epiteliais
VERO SLAM	<i>African Green Monkey Kidney Cells com receptores SLAM</i>	Rim de macaco verde africano	RPMI	Células epiteliais
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney fibroblasts</i>	Rim de hamster	MEM	Células do tipo fibroblasto
CRIB	Cells Resistant to Infection with BVDV-1	Rim bovino	MEM	Células epiteliais
CRFK	<i>Crandell Rees Cat Kidney</i>	Córtex de rim felino	MEM	Células epiteliais
HRT-18	<i>Human Rectal Tumor</i>	Tumor colorretal humano	MEM	Células epiteliais

Fonte: Guerra, 2022.

MEM: Meio essencial mínimo; RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*.

3.4 Produção de vacinas autógenas contra papilomatose bovina e canina

Existem as vacinas profiláticas e as vacinas terapêuticas contra o papilomavírus. O Setor de Virologia produz vacinas terapêuticas autógenas, que favorece a regressão de lesões já existentes no animal acometido (Alfieri et al. 2012). As solicitações de produção de vacinas aconteciam em torno de duas vezes ao mês.

Para a produção de vacinas autógenas contra papilomatose bovina e canina são necessários vários dias. No dia de recebimento das amostras de papilomas, deve ser feita a lavagem em água corrente para retirada de pelos e tecido morto, pesagem em balança de precisão, cálculo de quantas doses podem ser realizadas (com 5 gramas de

papiloma bovino é possível produzir 3 doses de vacinas, e com 1 grama de papiloma canino 3 doses), e comunicação com o produtor para saber quantas doses de vacina devem ser produzidas. No segundo dia, utilizando-se uma câmara de fluxo específica, deve ser feita a maceração dos papilomas com solução de Hanks e clorofórmio, para que seja feita a inativação viral. Essa mistura deve ser agitada por 20 minutos e, posteriormente, congelada por 24 horas. Passada as horas necessárias, deve-se descongelar lentamente a garrafa contendo a vacina dentro de geladeira e, dentro de uma câmara de fluxo, a vacina deve ser alíquotada em tubos Falcon para que seja centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação será possível fazer a separação da vacina e do clorofórmio, pois haverá três fases distintas e bem delimitadas. Todo o volume recuperado após a centrifugação deve ser anotado, coletado em novo frasco estéril, acrescentado formol na proporção de 0,25% do volume total recuperado e permanece em agitador de 12 a 18 horas.

Passadas as horas necessárias para ocorrer a inativação viral por formol, deve ser feita uma alíquota de 1 mL para análise microbiológica feita em laboratório parceiro. Laudos negativos são recebidos após 120 horas e permitem a embalagem e envio da vacina pra o produtor que solicitou. Laudos positivos para crescimento bacteriano envolvem o acréscimo de formol em proporção igual à utilizada anteriormente, agitação por 12 a 18 horas e posterior análise microbiológica. Caso mais uma vez haja o recebimento de laudo positivo, pode ser feito o acréscimo de antibiótico penicilina/estreptomicina. Se houver novo laudo positivo para crescimento microbiológico mesmo após o acréscimo de antibiótico, a vacina é descartada e comunicado ao produtor para que seja feita uma nova coleta. Para envio ao produtor, a embalagem da vacina deve ser feita em frasco estéril com descrição do conteúdo e informações à respeito das doses e caixa de isopor com gelo reutilizável para manter o produto refrigerado até a chegada na propriedade.

3.5 ELISA

O ensaio de imunoadsorção enzimático pode ser realizado para o diagnóstico direto, através da detecção de antígenos, ou indireto, através da detecção de

anticorpos. Durante o período de estágio foi utilizado ensaio ELISA sanduíche da marca ID vet. e IDEXX para a detecção de antígeno da diarreia viral bovina (BVDV), e para detecção de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (BLV). Em geral, os diagnósticos realizados através dos ensaios ELISA eram solicitados semanalmente, totalizando 58 amostras analisadas para BVDV e 186 amostras analisadas para leucose bovina.

Este tipo de ensaio foi muito realizado, pois o vírus da diarreia viral bovina pode levar ao nascimento de bezerros persistentemente infectados (PI) caso haja infecção pré-natal e esses animais atuam como importantes fontes de transmissão vírica aos outros animais do rebanho (Flores, 2012). Por isso, a identificação destes animais PI é essencial para possibilitar um melhor controle da disseminação da doença.

Para realização do diagnóstico de BVDV através do kit da marca ID vet. deve ser realizada a disposição das amostras de soro e controles em placas de 96 micropoços com anticorpos fixados ao fundo. Caso haja antígeno de BVDV nas amostras pipetadas, ocorrerá a formação de um complexo antígeno-anticorpo estável que não se desprenderá durante as lavagens do protocolo. Esse complexo fixado ao fundo dos micropoços contendo amostras positivas irá realizar uma nova ligação com o conjugado que será pipetado e as subsequentes lavagens não o desprenderá. Posteriormente ao conjugado e às lavagens, adiciona-se o substrato, o qual é incubado durante XX minutos/horas, para permitir leitura em espectrofotômetro. Após esse período, acrescenta-se a solução de parada e a leitura é realizada em 450nm.

A leucose enzoótica bovina é outra doença bovina importante na região, pois pode ocorrer a infecção persistente dos animais e esses atuarem como fontes de disseminação (Benitez, 2020). Como não há vacina ou tratamento, o controle da doença é feito através da erradicação e eliminação dos animais. O teste ELISA para detecção de leucose enzoótica bovina utilizado na maioria das vezes foi da marca IDEXX, e o seu protocolo envolve a colocação das amostras de soro e controles em placas de 96 micropoços impregnadas com antígeno BLV, formação de complexo antígeno-anticorpo, lavagens, adição de conjugado, incubação, mais lavagens, adição de substrato e solução de parada. A leitura deve ser feita em espectrofotômetro calibrado a 450 nm.

3.6 Extração de material genético

3.6.1 DNA

A extração do material genético era realizada para utilização nas técnicas de PCR e RT-PCR quase diariamente. Pode ser realizada a extração de DNA por Trizol através de amostras de soluções, monocamadas de células, sangue, suabes e tecidos. A proporção utilizada para ressuspensão, realizada em microtubos livres de DNase e RNase, deve ser 100 a 150 mg de amostra para 900 uL de Trizol e deve ser realizada uma incubação em temperatura ambiente por 5 minutos. Passados os minutos necessários para a primeira incubação, deve-se acrescentar 120 uL de clorofórmio ao microtubo e agitá-lo vigorosamente. Incuba-se novamente em temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifuga-se os microtubos por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C e coleta-se a fase aquosa superior translúcida e, também, a fase intermediária, transferindo os coletados para outros microtubos livres de RNase e DNase. Adiciona-se 375 uL de álcool isopropílico, incuba-se por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifuga-se por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C para permitir a formação de pellet e retirada do sobrenadante. Para lavagem do pellet é necessário a adição de 375 uL de etanol 75% e centrifugação a 9.500 rpm por 5 minutos. O etanol adicionado deve ser removido por inversão e deve ser feita uma nova centrifugação por no máximo 1 minuto em máxima rotação, e a última gota deve ser retirada com pipeta. A secagem deve ser feita em temperatura ambiente por 5 minutos e o pellet deve ser dissolvido em 40 uL de Tris-EDTA (TE) pré-aquecido. A armazenagem dos tubos contendo DNA pode ser feita em freezers a -20°C ou -80°C.

3.6.2 RNA

A extração de RNA por Trizol pode ser realizada a partir de soluções, monocamadas de células, sangue, suabes ou tecidos, também era realizado de forma diária para diagnóstico. Deve ser macerado com o auxílio de bisturi, 100 a 150 mg de amostra, ressuspende-se em microtubos livres de RNase e DNase com o auxílio de

pipeta em 900 uL de Trizol e incuba-se por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esta primeira incubação deve ser acrescentado 200 uL de clorofórmio, agitado vigorosamente e novamente incubado em temperatura ambiente, por 3 minutos. Centrifuga-se por 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C, retira-se a fase superior translúcida e transfere-se para um outro microtubo livre de RNase e DNase. Acrescenta-se 500 uL de álcool isopropílico e incuba-se por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente, os microtubos devem ser centrifugados a 14.000 rpm a 4°C por 10 minutos para que seja possível a formação de pellet e retirada do sobrenadante. Adiciona-se 500 uL de etanol 75% para lavagem do pellet e posterior centrifugação a 9500 rpm por 5 minutos. Remove-se o etanol por inversão e faz-se uma centrifugação rápida por 1 minuto na rotação máxima, e a última gota deve ser retirada com pipeta. Os microtubos devem secar à temperatura ambiente por 5 minutos e depois, deve-se dissolver o pellet em 40 uL de TE pré-aquecido. O armazenamento pode ser realizado em freezer a -20°C ou -80°C.

3.7 Imunofluorescência

A imunofluorescência era utilizada para permitir o diagnóstico de diarreia viral bovina não citopática e raiva. No Setor de Virologia esta técnica era realizada de forma semanal. Para o preparo das lâminas de imunofluorescência, primeiramente devem ser limpas as lâminas com algodão e álcool para retirada de quaisquer resquícios orgânicos que possivelmente estejam na lâmina já previamente lavada e limpa. Prepara-se as células que serão utilizadas com uma nova tripsinização e ressuspensão com soro fetal bovino, meio de cultivo e coloca-se as gotas desta solução na lâmina. Após a colocação das células nas lâminas é preciso que estas sejam dispostas dentro de um estojo plástico contendo papéis úmidos para que não ressequem e possam aderir ao ficar por 2 horas dentro de estufa com CO₂. Passadas as 2 horas, deve-se checar no microscópio de inversão se houve aderência das células ao fundo das lâminas, caso as células estejam aderidas, as lâminas devem ser invertidas para retirada das gotas e acrescenta-se acetona gelada por 10 a 15 minutos, para fixação. Lava-se com água destilada e PBS 2 vezes subsequentes e seca-se com auxílio de

secador. Com as lâminas secas, acrescenta-se o anticorpo primário e incuba em estufa por 1 hora; após incubação deve ser feita nova lavagem em água destilada e PBS e secagem com secador. Adiciona-se o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo e novamente deve ser feita uma incubação em estufa por 1 hora. Após esse intervalo, pode ser feita a coloração azul de Evans para permitir a análise em microscopia de imunofluorescência.

3.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase é um método diagnóstico da biologia molecular com grande versatilidade, sensibilidade e especificidade (Brum & Weiblen, 2012). Permite a detecção e amplificação de quantidades muito pequenas de ácidos nucleicos encontradas em tecidos infectados, secreções, fluidos corporais ou excreções (Flores & Cargnelutti, 2012).

A técnica de PCR convencional era utilizada pelos alunos de pós-graduação em suas pesquisas e, também, na rotina de diagnósticos de forma diária. Houve o desenvolvimento de um PCR *Multiplex* durante o período do estágio e este ensaio exige que seja realizada diversas vezes a técnica de PCR convencional para estipular limites de sensibilidade e especificidade, devido a isto foi possível realizar inúmeras vezes a produção de misturas para amplificação de alvos genéticos, leitura em gel de agarose e visualização dos produtos em transiluminador UV.

Primeiramente deve ser realizada a extração de material genético da amostra e caso seja RNA, devemos fazer uma etapa extra com a produção de mix para cDNA para permitir a formação da fita de DNA complementar. Com o cDNA ou DNA, é feito um mix para identificação do vírus através da técnica de PCR contendo água, tampão, desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs), magnésio, iniciador senso (*primer F*), iniciador antisenso (*primer R*), enzima Taq DNA polimerase (Taq) e material genético a ser analisado. Os microtubos devem ser acondicionados nos termocicladores para permitir a reação e amplificação da sequência de ácidos nucleicos que almeja-se encontrar. Após a reação ocorrer, pode ser feita a leitura em gel de agarose para visualização das bandas dos produtos amplificados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o estágio curricular obrigatório foi possibilitado o desenvolvimento profissional na área de medicina veterinária preventiva e diagnósticos em doenças víricas. É um período de crucial vivência com a área de atuação de escolha do futuro profissional médico veterinário, permite a prática e aprimoramento do conhecimento científico adquirido durante os muitos anos de estudo da graduação. O Setor de Virologia é referência no diagnóstico de doenças infecciosas virais, desenvolve pesquisas inovadoras e permitiu o aprendizado em diferentes técnicas.

A importância do acompanhamento na rotina dos profissionais que atuam na área da virologia veterinária foi imprescindível para a confirmação da área de interesse. Não somente devido às técnicas aprendidas e aos protocolos de segurança, mas também, por permitir contato com todas as etapas necessárias para o trabalho no Setor de Virologia. As medidas necessárias para permitir que o diagnóstico de doenças víricas aconteça de forma ideal envolvem muitos detalhes que nem sempre são levados em consideração. O estágio permitiu que houvesse um entendimento mais amplo em todas as fases do processo, desde o recebimento das amostras e conferência de pré-requisitos mínimos como quantidade e conservação, até a comunicação com profissionais médicos veterinários em relação à resultados inconclusivos.

A virologia é uma área de extrema importância de forma global, pois pode causar pandemias, zoonoses e perdas econômicas. Essa área da ciência ainda apresenta diversas lacunas em relação à patogenia e tratamento destas doenças e devido a isto ainda é necessário que haja constantes estudos para o um melhor entendimento e permitir melhores protocolos de prevenção e tratamento para humanos e animais.

REFERÊNCIAS

Alfieri, A.A, Lunardi, M, Alfieri, A.F. Papilomarividae. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, p 475-476, 2012.

Benitez OJ, Norby B, Bartlett PC, Maeroff JE, Grooms DL. Impact of bovine leukemia virus infection on beef cow longevity. **Prev Vet Med**. 2020 Aug;181:105055.

Brum, M.C.S e Weiblen, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM, 2012.

Flores, E.F.; Cargnelutti, J.F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: Flores, Eduardo Furtado (org). **Virologia veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: editora UFSM. p. 333- 360, 2012.

Maclachlan, N. James; Dubovi, Edward J. **Fenner's Veterinary Virology**. 4. Ed. Oxford: Elsevier, 2011. 491 p.

Martins, A.K.A. Técnicas básicas em Cultura de Células. In: CURI, Carmem Maldonado Peres Rui (org). **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: editor Guanabara Koogan S.A., 2005.

Miranda, M. (2018). A CONTRIBUIÇÃO DO MÉDICO VETERINÁRIO A SAÚDE ÚNICA- ONE HEALTH. **Psicologia E Saúde Em Debate**, 4(Suppl1), 34–34.

Overgaauw PAM, Vinke CM, Hagen MAEV, Lipman LJA. A One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2020 May 27;17(11):3789.