

# ANÁLISE COMPARATIVA DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE POXVIROSES

## COMPARATIVE ANALYSIS OF TECHNIQUES FOR POXVIRUSES DETECTION

Inareí José Paulini Júnior <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Professor Doutor da Faculdade Venda Nova do Imigrante - FAVENI

Autor para correspondência : Inareí José Paulini Júnior. Avenida Angelo Altoé, 888 , Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil, CEP: 29375-000. Email : inareip@yahoo.com.br.

### RESUMO

A família Poxviridae consiste num grupo de vírus DNA dupla fita, de morfologia semelhante e que se replica inteiramente no citoplasma de células hospedeiras. Os gêneros Orthopoxvirus e Parapoxvirus são os mais importantes do ponto de vista de infecção em humanos e animais. Os gêneros causam doença vesicular aguda, com diferentes graus de gravidade para o hospedeiro. Infecções por esses vírus têm ocorrido frequentemente nos últimos 10 anos no Brasil e vêm trazendo sérios prejuízos econômicos e grande impacto na saúde pública

Aqui, avaliou-se três técnicas para detecção de poxvírus: isolamento viral em cultura celular, isolamento viral em ovos embrionados e microscopia eletrônica de transmissão. As três técnicas apresentam vantagens e desvantagens. A questão da escolha de qual técnica a ser utilizada dependerá das condições de cada laboratório. Isso se baseará na demanda de amostras, treinamento de pessoal para realização e custo.

Palavras Chave:

### ABSTRACT

Family Poxviridae consists of a group virus DNA double strand, and morphology similar to that replicates itself fully in the cytoplasm of host cells. The genera Orthopoxvirus and Parapoxvirus are most important from the standpoint of infection in humans and animals. The genera causing acute vesicular disease, with varying degrees of severity for the host. Infections with these viruses have occurred frequently in the last 10 years in Brazil and have brought great economic losses and serious impact on public health. Here, we evaluated three techniques for poxvirus detection: viral isolation in cell culture, viral isolation in embryonated eggs and electron microscopy. The three techniques present advantages and disadvantages. The question of the choice of which technique to use will depend on the conditions of each laboratory. This will be based on sample demand, personnel training and cost.

Keywords: poxvirosis, Orthopoxvirus, diagnosis

## INTRODUÇÃO

Os vírus da família Poxviridae infectam tanto vertebrados como invertebrados sendo o gênero *Orthopoxvirus* o mais importante do ponto de vista da infecção em humanos<sup>1,2,3,4,7,8,10,11,12</sup>. Além disso, estão entre os mais complexos vírus conhecidos, os quais replicam no citoplasma das células hospedeiras. Possuem genoma de DNA dupla fita que consiste em aproximadamente 270 kpb<sup>4,7,8,10,11,12</sup>. Nos últimos anos, inúmeros casos de doença pústulo-vesicular vêm sendo notificados em alguns estados brasileiros<sup>1,2,4,6,12,14,15,16,17</sup>. Essas infecções acometem bovinos leiteiros e pessoas, principalmente ordenhadores e seus familiares. Os surtos que ocorreram nos últimos anos na região sudeste causaram grandes prejuízos econômicos, principalmente no que diz respeito à produção de leite, uma vez que, em algumas propriedades, 100% dos bovinos foram acometidos, além de ter sido detectado no leite e também seus subprodutos, como o queijo<sup>1,2,4,6,12,14,15,16,17</sup>.

As principais técnicas utilizadas para diagnóstico de poxviroses são: isolamento viral em culturas celulares ou em ovos embrionados, microscopia eletrônica, sorologia, diagnóstico histopatológico e técnicas de biologia molecular<sup>3,7,8,10,11,13</sup>.

No presente estudo, avaliou-se três técnicas comumente usadas na análise de poxviroses. São elas: isolamento viral em cultura celular, isolamento viral em ovos embrionados e microscopia eletrônica de transmissão. Todas as três são passíveis de execução, porém, possuem certos detalhes que impossibilitam uma resposta confiável, rápida e barata ao clínico.

## OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram detalhar a execução de três técnicas utilizadas para detecção de poxvírus, visando mostrar suas vantagens e desvantagens.

## MATERIALE MÉTODOS

### Multiplificação viral em células Vero

Células Vero, em monocamada, cultivadas em garrafas de cultivo celular de 175cm<sup>2</sup> foram infectadas com um volume de 5mL de suspensão viral 0,1 m.o.i diluída em meio DMEM – F12 (GibcoBrl), acrescido de gentamicina (50mg/L, Gibco). Após o período de 1 hora de adsorção em estufa a 37°C, foi acrescentado 20 mL de meio DMEM-F12 suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico gentamicina (50mg/L). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C até o aparecimento de efeito citopático (ECP).

### Multiplificação viral em membrana corioalantóide de ovos embrionados

Ovos embrionados com aproximadamente 10 dias (provenientes da PESAGRO – RJ) foram utilizados para multiplicação viral. Realizou-se o deslocamento da câmara

de ar dos ovos com auxílio do ovoscópio. Os ovos encontravam-se previamente limpos e desinfetados com tintura de iodo 2%. Aproximadamente, 100µL de *Vaccinia virus* WR (vírus protótipo) com 0,1 m.o.i foi inoculada em membrana corioalantóide. Os ovos foram acondicionados em estufa umedecida a 37 °C durante 72 horas e transferidos para câmara fria a 4 °C por 12 horas. As membranas corioalantóides foram retiradas assepticamente dos ovos, coletando-se a região com presença de lesões do tipo “pocks”, e armazenadas a -70 °C.

### Microscopia Eletrônica de Transmissão

Monocamadas de células Vero foram infectadas com 0,1 m.o.i da cepa *Vaccinia virus* WR (vírus protótipo). A presença do efeito citopático foi avaliada após 48 horas em microscópio óptico invertido. Para análise por microscopia eletrônica de transmissão, as células foram fixadas depois de 48 horas de infecção com solução contendo glutaraldeído 1%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 0,5mM e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, com 5% de sacarose por 1 hora à temperatura ambiente<sup>12</sup>. Os procedimentos pós – fixação e inclusão em resina foram seguidos de acordo com os procedimentos já descritos<sup>12,13,18</sup>. Cortes ultrafinos dos blocos parafinizados, com 50 a 80nm de espessura, foram recolhidos em grades de cobre e contrastados por 15 min com acetato de uranila 5% em água, lavados em água, e a seguir colocados em citrato de chumbo por 2 minutos, sendo novamente lavados em água e observados ao Microscópio Eletrônico Magnani, a 80KV<sup>12</sup>.

## RESULTADOS

Em culturas celulares, *Vaccinia virus* WR (replicado em Vero e purificado por ultracentrifugação) ocasionou efeito citopático característico de infecção viral. Ocorreu formação gradual de grande quantidade de sincícios e células gigantes multinucleadas (Figura 1). Esse fenômeno está relacionado com a cinética de infecção e com a quantidade de partículas virais presentes no inóculo, em relação ao número de células em cultura. A multiplicação viral também foi feita em membrana corioalantóide de ovos embrionados e o tipo de lesão foi característico (Figura 2). Os danos resultantes da infecção por *Vaccinia virus* em culturas celulares são devastadores e perceptíveis quando analisados por Microscopia Eletrônica de Transmissão. O ECP é caracterizado pelo aumento da permeabilidade de membrana, vacuolização e inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas. Os distúrbios causados pela inibição da síntese de proteínas são drásticos para a célula (Figura 3).

A infecção por poxvírus apresenta vários aspectos relevantes que tornam a abordagem diagnóstica no laboratório um contínuo desafio e uma renovação infundável<sup>12,13</sup>. As sutis diferenças entre os gêneros *Orthopoxvirus* e *Parapoxvirus* fazem com que o diagnóstico laboratorial

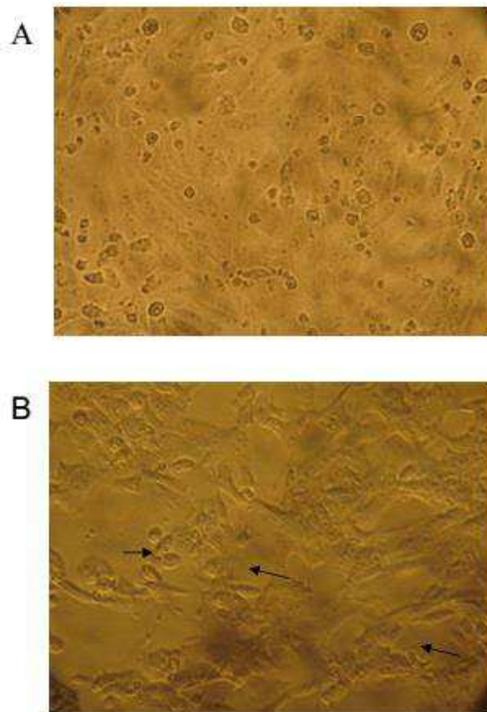


Figura 1 : Células Vero não infectadas por *Vaccinia virus* WR em 48h. (B) Células Vero em monocamada infectadas com *Vaccinia virus* WR. formação de vacúolos, fusão de membranas e células em formato estrelado eirregular (setas). Após 48 de infecção pode-se observar o efeito citopático . Visualização ao Microscópio Óptico Invertido Axiovert 135 M , aumento 100X.

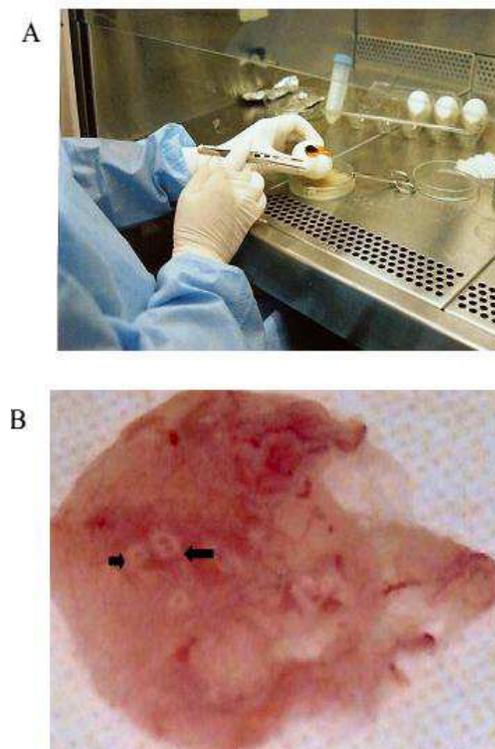


Figura 2 – (A) Procedimento para retirada de Membrana Corioalantóide infectada com VACV WR. (B) Membrana Corioalantóide de ovo embrionado infectada com *Vaccinia virus* WR. Lesão característica de infecção “pocks” (setas).

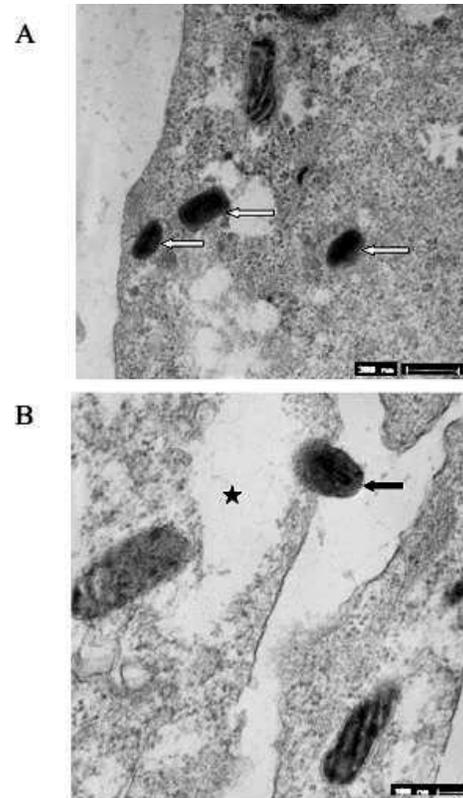


Figura 3 : Micrografia eletrônica de células Vero com 48 horas de infecção pelo *Vaccinia virus* WR. (A) Aumento na quantidade de partículas virais maduras no citoplasma (setas). (B) As células começam a apresentar citoplasma com grandes espaços vazios (estrela) sugerindo início de degeneração celular e observa-se partículas virais maduras sendo liberadas no meio extracelular (seta).

assuma um aspecto de curiosidade constante e gere a necessidade de atualização frequente<sup>12,13</sup>.

Os métodos convencionais tanto sorológicos como biológicos quando aplicados parecem insuficientemente efetivos para identificação e rápido diagnóstico de poxvírus. As análises biológicas demandam muito tempo para sua realização (cerca de 3 a 6 dias) e envolvem manipulação direta de material infectivo. Os métodos sorológicos mostram-se pouco sensíveis e, portanto, insuficientes para ensaios clínicos. Os métodos baseados em análise genômica são poderosas ferramentas para diagnóstico de infecções, por permitir alto grau de comparação das diferentes cepas de *Orthopoxvirus*. No entanto, é uma metodologia demorada e requer propagação viral, purificação do vírus e equipamento especializado<sup>13</sup>.

No presente estudo, avaliou-se três ferramentas diagnósticas para a detecção do poxvírus. A técnica de isolamento viral em cultura celulares mostrou-se a mais eficiente entre elas (Figura 1). Porém, é uma técnica que não é rápida e necessita de pessoal com treinamento especializado para sua execução. Esses dados corroboram com estudos anteriores (Quadro 1)

A técnica de isolamento viral em ovos embrionados mostrou-se confiável, no entanto, possui as mesmas

TESTE	ESPECIFICIDADE	Nº AMOSTRAS	RAPIDEZ	CUSTO	SENSIBILIDADE
M. ELETRONICA	MORFOLOGIA	BAIXO	1 mês	ALTO	MÉDIA
CULTURA CELULAR	VIRUS REPLICATIVO	BAIXO	48h	ALTO	ALTA
EIA/IF	TIPO/GRUPO	ALTO	2h-12h	ALTO	MÉDIA
PCR	ALTA	MÉDIO	12h	ALTO	MUITO ALTA
OVOS EMBRIONADOS	ESPECÍFICO	BAIXO	72h	MÉDIO	BAIXO
SOROLOGIA	TIPO/GRUPO	ALTA	< 6h	BAIXO	ALTA

EIA – ensaio imunoenzimático . IF – imunofluorescência. PCR – reação em cadeia da polimerase.

Quadro 1: Comparação das propriedades e eficiência dos testes diagnósticos (Adaptado de SCHRAMLOVÁ et al, 2010).

deficiências que o isolamento em cultura. É mais demorada e cara. Além disso, a análise de grande quantidade de amostras torna-se inviável (Figura 2).

A microscopia eletrônica nos permite evidenciar claramente a presença da partícula viral, porém, esta técnica demanda muito tempo. Seu custo é alto pois necessita de reagentes e equipamentos caros (microscópio transmissão). A análise de grande quantidade de amostras demandaria muitos recursos (Figura 3).

O MPCR (nested-multiplex PCR) é uma técnica que apresenta alta especificidade e sensibilidade de análise. Porém, é uma técnica que requer acurácia para ser executada. No contexto de um diagnóstico de vírus mutável é uma técnica de enorme importância. Essa ferramenta é aplicável em um laboratório de rotina de diagnóstico de poxvíroses e tem grande importância em estudos mais aprofundados sobre a biologia dos poxvírus e seu caráter epidemiológico<sup>1,2,9,13,14,15,16</sup>. Essa técnica é mais cara do que todas as outras e sua análise não foi avaliada neste estudo.

Os testes imunocromatográficos vêm sendo amplamente utilizados e sua avaliação poderia fornecer dados

interessantes. Esses testes são rápidos, baratos e não precisam de pessoal especializado para sua realização. Além disso, podem ser aplicados em amostras de campo, onde recursos laboratoriais são escassos<sup>9,18</sup>. Essa técnica mereceria atenção especial em novos estudos epidemiológicos nas fazendas onde continuam aparecendo infecções por poxvírus nos rebanhos bovinos e nos ordenhadores.

### CONCLUSÕES

Finalmente, este estudo colabora para apontar possíveis indicações na utilização prática de técnicas de diagnóstico para poxvíroses. A interpretação de qualquer resultado laboratorial também requer a integração de informações clínicas e epidemiológicas, e de outros dados laboratoriais para que se possa chegar a um grau maior de consistência e o conjunto de dados permita o maior valor preditivo possível. A escolha da principal técnica a ser utilizada irá depender da natureza/quantidade de amostras e dos recursos laboratoriais disponíveis.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAO J. (2009) Nested-multiplex PCR detection of *Orthopoxvirus* and *Parapoxvirus* directly from exanthematic clinical samples. *Virology Journal* 2009, 6:140.
2. ABRAHAO J. (2010) Rapid Detection of Orthopoxvirus by Semi-Nested PCR Directly From Clinical Specimens: A Useful Alternative for Routine Laboratories. *Journal of Medical Virology* 82:692–699 (2010).
3. BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. (2000) Poxvírus. In: *Microbiologia Médica*. 21.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 330-339.
4. BRANDAO G. C., KROON, E. G, DUARTE M.G. R, BRAGA, F. C., FILHO, J.D. S, OLIVEIRA, A.B. (2010b). Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02924.x/pdf>
5. CZERNY, C.P. (1996) A monoclonal blocking-ELISA for detection of orthopoxvirus antibodies in feline sera. *Veterinary Microbiology* 52,185-200.
6. DAMASO, C.R.A., ESPOSITO, J.J., CONDIT, R.C., MOUSSATCHÉ, N. (2000) An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*, 277: 439-449.
7. ESPOSITO, J.J., FENNER, F. (2005) Poxviruses. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p 2885-2921.
8. FENNER, F. (1996) Poxviruses. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds.) *Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, V.2, p. 2673-2682.

9. MEYER, H., ROOP, S.L. ESPOSITO, J.J. (1997) Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate *Orthopoxvirus*. *Journal Virological Methods*, 64:217-221.
10. MOSS, B. (1996) *Poxviridae: the viruses and their replication*. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., (eds.) *Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, V.2, p. 2637-2671.
11. MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. (1999) Poxviridae. In: MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J., (eds.) *Veterinary Virology*, 3.ed. San Diego: Academic Press, p. 277-291.
12. PAULINI, I. J. (2015) Cinética de infecção do vírus Vaccinia em células Vero: Perspectivas para utilização como modelo experimental na avaliação de drogas anti-Orthopoxvírus. *Archives of Veterinary Science*, v.20, n.3, p.59-64, 2015.
13. SCHRAMLOVÁ, J. (2010) The Role of Electron Microscopy in the Rapid Diagnosis of Viral Infections – review. *Folia Microbiol.* 55 (1), 88–101 (2010)
14. SCHATZMAYR, H.G.(2001) Detection of poxvirus in cattle associated with human cases in the State of Rio de Janeiro: Preliminary Report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95 (5): 625-627.
15. SCHATZMAYR, H.G.(2009). Infecções humanas causadas por poxvirus relacionados ao vírus vaccinia no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(6):672-676, nov-dez, 2009.
16. SILVA-FERNANDES, A.T., TRAVASSOS, C.E.P.F, KROON, E.G. (2009) Natural human infections with Vaccinia vírus during bovine vaccinia outbreaks. *Journal of Clinical Virology* 44, p. 308-313.
17. TRINDADE, G.S.(2003) Araçatuba vírus: a vaccinia like vírus associated with infection in humans and cattle. *Emerg.Infect.Dis.*, 9:155-160.
18. ULAETO, D., GROSENBACH, D., HRUBY, D. (1996) The vaccinia virus and A-type inclusion proteins are specific markers for intracellular mature virus particule. *Journal of Virology*. 70:3372-77.