

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Vírus de Invertebrados, Suínos e Aves

Fotos: M. E. B. Castro - CENARGEN

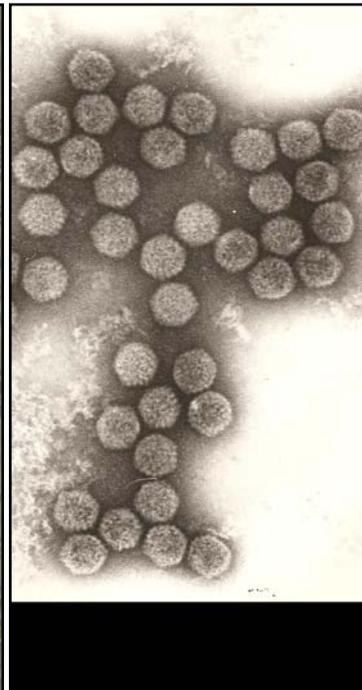
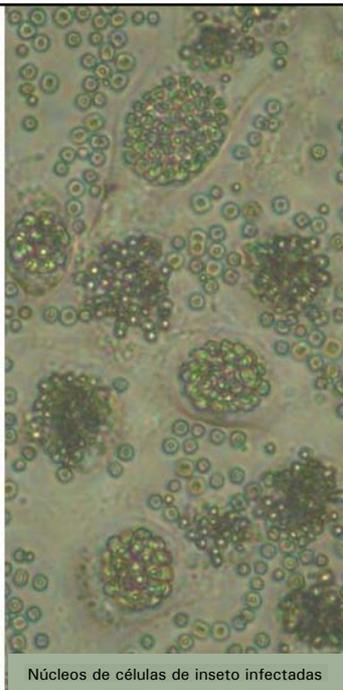
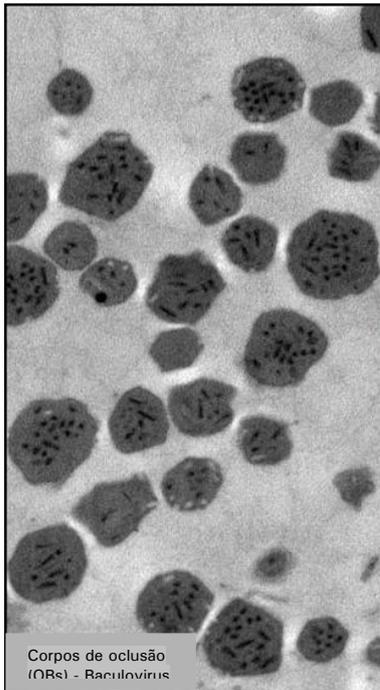


Foto: Acervo da Embrapa Suínos e Aves

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

331 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

152 *Embrapa Suínos e Aves
ISSN 0101-6245*

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Vírus de Invertebrados, Suínos e Aves

Maria Elita Batista de Castro
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Marlinda Lobo de Souza
William Sihler
Paulo Augusto Esteves
Mateus Lazzarotti

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Fotos da capa: M. E. B. Castro (CENARGEN) e P. A. Esteves (CNPSA)

1ª edição (*online*)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Vírus de Invertebrados, Suínos e Aves. / Maria Elita Batista de Castro, Zilda Maria de Araújo Ribeiro, Marlinda Lobo de Souza, William Sihler, Paulo Augusto Esteves e Mateus Lazzarotti. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

20 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 331; Documentos / Embrapa Suínos e Aves, 152).

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Vírus. 4. Invertebrados. 5. Suínos. 6. Aves. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Ribeiro, Zilda Maria de Araújo. III. Souza, Marlinda Lobo de. IV. Sihler, William. V. Esteves, Paulo Augusto. VI. Lazzarotti, Mateus. VII. Título. VIII. Série.

589.9 - CDD

© Embrapa 2011

Autores

Maria Elita Batista de Castro

Ph.D. em Virologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
elita.castro@embrapa.br

Zilda Maria de Araújo Ribeiro

Mestrado em Fitopatologia, Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
zilda.ribeiro@embrapa.br

Marlinda Lobo de Souza

Ph.D. em Microbiologia, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
marlinda.souza@embrapa.br

William Sihler

Mestrado em Biologia Molecular, Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
william.sihler@embrapa.br

Paulo Augusto Esteves

Ph.D. em Ciências Veterinárias, Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves
paulo.esteves@embrapa.br

Mateus Lazzarotti

Graduação em Farmácia, Bioquímica e Tecnologia de Alimentos, Analista da Embrapa Suínos e Aves
mateus.lazzarotti@embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	09
Vírus de invertebrados: Coleção de Vírus de Invertebrados (CVI)	09
Coleta de amostras	10
Isolamento	10
Purificação de vírus	10
Identificação e caracterização	10
Classificação taxonômica – Nomenclatura	11
Família	11
Gênero	11
Espécie	11
Organização dos nucleocapsídeos nos corpos de oclusão (OBs)	11
Genoma	11
Ocorrência e multiplicação	12
Ciclo de vida	12
Utilização	12
Caracterização morfológica	12
Caracterização bioquímica	13
Caracterização molecular	13
Preservação	14
Multiplicação de vírus	14
Sistemas de infecção <i>in vivo</i>	14
Sistemas de infecção <i>in vitro</i>	14
Potencial de uso	15
Documentação e informatização	15
Vírus de suínos e aves – Coleção de micro-organismos de interesse para a suinocultura e avicultura (CMISEA)	15
Coleta de amostras	15
Importância	15
Procedimento	16
Isolamento e multiplicação viral	16
Purificação de partículas virais	16
Manipulação: meios de cultivo	16

Exames ao microscópio eletrônico de luz (MET: transmissão; MEV: varredura) –	16
Importância e aplicações	16
Teste de infectividade <i>in vivo</i>	16
Caracterização	16
Definição	16
Importância	17
Análise bioquímica	17
Análise molecular	17
Preservação	17
Envio de amostras (transporte)	18
Referências	19

Vírus de Invertebrados, Suínos e Aves

Maria Elita Batista de Castro
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Marlinda Lobo de Souza
William Sihler
Paulo Augusto Esteves
Mateus Lazzarotti

Introdução

No presente Manual, estão descritos os procedimentos básicos e as principais técnicas utilizadas para coleta, isolamento, identificação, caracterização, preservação e multiplicação de vírus de invertebrados e vírus de interesse para a suinocultura e avicultura.

Duas Coleções estão aqui listadas: Coleção de Vírus de Invertebrados (CVI), mantida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), e a Coleção de Micro-organismos de Interesse para a Suinocultura e Avicultura (CMISEA), mantida na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC).

O objetivo deste manual é fornecer informações básicas sobre procedimentos a serem adotados para manutenção das coleções de vírus em suas atividades essenciais, visando dar suporte ao Sistema de Curadorias de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA.

Vírus de invertebrados: Coleção de Vírus de Invertebrados (CVI)

Vírus de invertebrados podem ser encontrados na natureza como excelentes agentes para o controle de pragas agrícolas e florestais. A identificação e caracterização desses vírus são atividades importantes na busca de novos agentes de controle biológico, sendo essenciais como suporte ao desenvolvimento, ao registro e à avaliação de bioinseticidas.

Atualmente são reconhecidas 25 famílias de vírus de invertebrados, sendo a família *Baculoviridae* pertencente ao grupo de vírus específicos de artrópodes (HERNIOU *et al.*, 2011). Em geral, os baculovírus componentes desta família são eficientes e oferecem maiores vantagens sobre os inseticidas clássicos, devido a sua especificidade e virulência ao inseto hospedeiro, além de serem ambientalmente seguros e compatíveis com outras estratégias de controle. Sua aplicação tem avançado bastante nas últimas décadas, tanto como inseticida biológico em programas de manejo integrado de pragas (MIP) quanto como vetores de expressão gênica para a produção de proteínas recombinantes em células de insetos e, mais recentemente, de mamíferos.

Coleta de amostras

As amostras são coletadas a partir de insetos mortos com sinais de infecção, ou ainda vivos com os sintomas característicos de infecção por vírus. Os vírus contaminam os insetos principalmente por via oral, mediante a ingestão do alimento, que em geral compõe-se de folhas de plantas. Outras formas de contaminação podem ser por canibalismo de insetos doentes, animais e insetos predadores, ou ainda por fatores climáticos (chuvas e ventos) e físicos (máquinas agrícolas utilizadas nas lavouras).

A coleta de insetos no campo também pode ser feita sistematicamente. Geralmente, realiza-se essa coleta quando os vírus ainda não foram encontrados para uma dada espécie de inseto, em uma determinada região, ou quando se pretende encontrar novos isolados (geográficos) de um determinado vírus.

Todo material coletado deve ser imediatamente acondicionado sob temperatura baixa, a fim de evitar sua deterioração. Além disso, isolados virais remetidos por diferentes instituições de pesquisa ou ensino são identificados e introduzidos na Coleção para processamento, identificação e caracterização.

Isolamento

Para o isolamento do agente patogênico, realiza-se inicialmente um exame físico geral do inseto infectado, observando-se as características inerentes à infecção causada por vírus. Os principais sintomas típicos de infecção viral são: coloração alterada da larva, corpos flácidos, mobilidade reduzida e larvas frequentemente presas pelos pseudópodos posteriores no topo das plantas.

Purificação de vírus

A primeira etapa da purificação de vírus é a homogeneização de tecidos do hospedeiro ou células infectadas em cultivo. O material contendo vírus pode ser suspenso em água destilada ou tampão adequado e em seguida homogeneizado. Algumas vezes, a adição de SDS 0,1% (dodecil sulfato de sódio) pode ser efetiva para a ruptura das células e redução de material contaminante. O material pode também ser congelado antes de ser homogeneizado para ajudar na ruptura das células. Após a maceração, os fragmentos celulares são removidos por filtração do material em diversas camadas de gaze, e o vírus é então recuperado no material filtrado. Para a purificação completa das partículas virais, são empregados procedimentos de ultracentrifugação em gradientes de sacarose (40 a 65%).

Identificação e caracterização

As amostras virais da Coleção (CVI) são caracterizadas ou parcialmente caracterizadas, dependendo, principalmente, do interesse e da demanda de uso no controle biológico de pragas. Essa atividade é de fundamental importância para maior conhecimento e disponibilização do material conservado (SOUZA *et al.*, 2001). A seguir, são citadas características gerais dos baculovírus usualmente utilizados como base para a caracterização.

Classificação taxonômica – Nomenclatura

Sistema adotado para classificação e nomenclatura de vírus – *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), que é revisado de 5 em 5 anos. O Relatório mais recente é o *Ninth Report of the ICTV* (KING *et al.*, 2011).

Família

Baculoviridae – Compreende um grande grupo de vírus, os baculovírus, que infectam somente invertebrados, principalmente insetos das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera.

Gênero

Alphabaculovirus – NPV específicos de lepidópteros.

Betabaculovirus – GV específicos de lepidópteros.

Gammabaculovirus – NPV específicos de himenópteros.

Deltabaculovirus – NPV específicos de dípteros.

> NPV – Nucleopolyhedrovirus (Grupo I, Grupo II): corpos de oclusão (OBs - *occlusion bodies*); forma poliédrica (0.15 a 15 μm); matriz proteica cristalina; poliedrina (29 a 33 kDa), principal componente estrutural dos poliedros.

> GV – Granulovírus: corpos de oclusão (OBs); forma ovocilíndrica (0.3 x 0.5 μm); matriz proteica cristalina; granulina (29 a 33 kDa), principal componente estrutural dos grânulos.

Espécie

O vírus é nomeado de acordo com a espécie do inseto hospedeiro do qual foi primeiro isolado. Ex.: *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) é o inseto em que o vírus foi encontrado pela primeira vez. O vírus isolado é um *nucleopolyhedrovirus*, com vírions contendo vários nucleocapsídeos por envelope. Portanto, a espécie é denominada de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV).

Organização dos nucleocapsídeos nos corpos de oclusão (OBs)

- *Multiple* (M) – Vários nucleocapsídeos por envelope (MNPV).
- *Single* (S) – Apenas um nucleocapsídeo por envelope (SNPV).

Genoma

DNA fita dupla, circular, *supercoiled*, de tamanho 80-180 kb, que codifica 90 a 180 genes. A replicação do DNA viral ocorre na maioria das vezes no núcleo das células.

Ocorrência e multiplicação

De ocorrência natural em uma variedade de diferentes espécies de invertebrados, tendo mais de 700 espécies de hospedeiros descritos. Estão distribuídos principalmente nas ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera. A multiplicação de vírus é totalmente dependente do hospedeiro, pois são parasitas intracelulares obrigatórios, possuem organização e composição estrutural características e processo único de replicação.

Ciclo de vida

Bifásico – Durante o ciclo de infecção, produzem dois fenótipos: vírus derivado de oclusão (*occlusion derived virus* – ODV) e vírus extracelular (*budded virus* – BV). Estes vírions são similares na estrutura dos nucleocapsídeos e diferem na origem e composição de seus envelopes e em suas funções.

- Infecção primária: via oral – OBs (corpos de oclusão); partículas responsáveis pela infecção inseto-inseto; estrutura altamente estável no meio ambiente.
- Infecção secundária: via intra-hemocélica – BVs (vírus extracelulares); partículas responsáveis pela infecção célula-célula (infecção sistêmica); BVs utilizadas também para a infecção *in vitro* (linhagens celulares de insetos).

Utilização

Agentes de controle biológico: bioinseticidas; vetores de expressão gênica: baculovírus recombinantes, proteínas recombinantes (indústria farmacêutica); e vetores de terapia gênica.

Praticamente todos os vírus armazenados na Coleção (CVI) são da família *Baculoviridae*. Porém, pela classificação taxonômica (KING *et al.*, 2012), estão descritas as seguintes famílias de vírus de invertebrados: (a) vírus de DNA – *Ascoviridae*, *Asfarviridae*, *Baculoviridae*, *Iridoviridae*, *Malacoherpesviridae*, *Nimaviridae*, *Polydnaviridae*, *Poxviridae* e *Parvoviridae* (*Dicistroviridae*, *Iflaviridae*); (b) vírus de RNA – *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Roniviridae*, *Flaviviridae*, *Nodaviridae*, *Picornaviridae*, *Roniviridae*, *Tetraviridae*, *Togaviridae*, *Tymoviridae*, *Birnaviridae*, *Reoviridae* (*Sedoreovirinae*, *Spinareovirinae*), *Metaviridae* e *Pseudoviridae*.

Caracterização morfológica

Microscopia ótica: utilizada principalmente para identificação e contagem de corpos de oclusão (poliedros), contagem de células e monitoramento de células infectadas. Microscopia eletrônica (transmissão e varredura): utilizada para comprovação da identificação e taxonomia do patógeno, com base na análise ultraestrutural de amostras do material isolado.

Cortes ultrafinos, resultantes de partículas virais purificadas, são processados e observados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para observação das várias estruturas (cortes transversal e longitudinal), como os vírions, que exibem nitidamente a presença de nucleocapsídeos, os vírions imersos em uma matriz proteica formando o corpo

de oclusão, ou ainda os diversos efeitos citopáticos, quando o material processado é composto por tecidos frescos de larvas infectadas (alterações morfológicas, replicação viral no núcleo das células, formação de estroma virogênico, etc).

Caracterização bioquímica

Partículas virais, chamadas corpos de oclusão (OBs), são purificadas a partir de ultracentrifugação em gradientes de sacarose (MARUNIAK, 1986) e então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Este é um método simples e eficaz que permite a separação de proteínas em um campo elétrico, de acordo com o tamanho das moléculas (LAEMMLI, 1970). Após a coloração do gel com *Coomassie brilliant blue* ou nitrato de prata, as proteínas estruturais, tais como a poliedrina (principal componente proteico dos poliedros dos *nucleopolyhedrovirus* - NPV) e a granulina (principal componente proteico dos grânulos dos *granulovirus* - GV), são detectadas e usualmente comparadas com marcadores de pesos moleculares conhecidos. Outro procedimento utilizado é a análise dos peptídeos sintetizados em cultura de células de inseto ao longo do ciclo de infecção, utilizando-se marcação radioativa com ³⁵S-metionina.

Caracterização molecular

Em geral, os estudos moleculares de vírus são desenvolvidos em sistemas de infecção *in vitro*. O estabelecimento de linhagens de células de insetos permissivas à replicação viral promoveu o avanço da biologia molecular de baculovírus. Para um maior detalhamento da caracterização de baculovírus para determinar sua relação e interação com o hospedeiro, análises moleculares são requeridas, baseando-se na correlação das informações genéticas com suas propriedades biológicas e funcionais.

Portanto, é interessante que se tenha inicialmente disponíveis partículas virais purificadas ou semipuras, DNA viral extraído e purificado e linhagens celulares suscetíveis ao vírus (hospedeiras). As técnicas e os protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989) e O'Reilly *et al.* (1992) são muito utilizados para purificação de DNA viral por extrações com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1); clivagem de DNA com enzimas de restrição (REN) e análise por eletroforese em gel de agarose.

A análise de restrição de DNA é uma valiosa técnica que, acoplada a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), hibridização (*Southern Blot*) e clonagem, é capaz de produzir fragmentos de DNA. Essa técnica permite construir bibliotecas genômicas, detectar variabilidade genética entre isolados virais (temporais e geográficos), distinguir diferentes baculovírus, identificar e localizar fragmentos contendo genes de interesse, promover amostras puras para sequenciamento, estimar o tamanho total do genoma, analisar sequências genéticas, e estabelecer as relações filogenéticas entre os vírus e sua taxonomia.

Outras técnicas de biologia molecular, como a construção e a análise de vírus recombinantes com mutações sítio-específicas – ou com inserções de sequências de DNA exógenas – têm sido utilizadas para aumentar o conhecimento da função e do controle de genes virais, para melhorar esses vírus como agentes de controle biológico e para facilitar o desenvolvimento de baculovírus como vetor de clonagem. A técnica de PCR, além de ser bastante utilizada em estudos de genes virais (conforme já citado), por se tratar de um método rápido e simples de diagnóstico para a detecção de baculovírus no meio ambiente,

é também uma interessante ferramenta de monitoramento após a liberação do vírus no campo.

Preservação

Os vírus são conservados principalmente na forma de partículas virais purificadas, corpos de oclusão – OBs (poliedros ou grânulos), ou suspensão viral semipurificadas mantidas em água destilada, em freezer a -20°C . Lagartas infectadas por vírus também são mantidas congeladas (acondicionadas a -20°C) até que sejam processadas para isolamento do vírus. Os vírus extracelulares (BVs), outro fenótipo viral, podem ser armazenados na geladeira ($+4^{\circ}\text{C}$). Outra forma de conservação de vírus é o acondicionamento a -80°C .

Ambos os fenótipos, OBs e BVs, armazenados nas formas de acondicionamento indicadas neste manual, apresentam estabilidade por longos períodos de tempo, não sendo detectadas variações significativas em sua infectividade (virulência).

Multiplicação de vírus

Sistemas de infecção *in vivo*

São utilizadas técnicas de inoculação e infecção de insetos para multiplicação viral (formação de estoques virais) e para testes de infectividade viral (espectro de hospedeiro, bioensaios). Os bioensaios são realizados para a avaliação da patogenicidade viral, que se baseia na determinação dos seguintes parâmetros de mortalidade: CL_{50} (concentração letal); DL_{50} (dose letal); TL_{50} (tempo letal); TS (tempo de sobrevivência); % (taxa de mortalidade); e TM (tempo de morte).

Insetos são criados com dieta artificial ou natural, sob condições controladas de temperatura (27°C), umidade (70%) e fotoperíodo (14 h/10 h). Em caso de insetos que ainda não possuem dieta artificial estabelecida, a manutenção do período larval do inseto é feita com folhas da planta hospedeira. A avaliação da sintomatologia da doença é feita diariamente. As larvas infectadas são coletadas logo após sua morte, o que em geral ocorre do 6º ao 9º dia após a ingestão do vírus.

Sistemas de infecção *in vitro*

Linhagens de células de insetos estabelecidas são utilizadas para a infecção com vírus extracelulares (BV). Após o período de adsorção do vírus, o inóculo é retirado e as células são mantidas a 27°C , em meio de cultura apropriado (TC-100 ou TNMFH suplementado com soro bovino fetal). Após 48 horas, o sobrenadante contendo as partículas formadas é coletado, podendo ser utilizado para novas infecções (produção de estoque viral e estudos de infecção, etc.). Para utilização adequada, essas partículas são tituladas pelos métodos "*end-point dilution - TCID₅₀*" ou "*plaque assay*". Para manutenção das linhagens celulares, são utilizadas técnicas de armazenamento em nitrogênio líquido (criopreservação) e/ou repicagem periódica das células em meio de cultura completo e mantidas em incubadoras a 27°C .

Potencial de uso

Os baculovírus podem ser utilizados como agentes de controle biológico de insetos-praga (bioinseticidas), vetores de expressão de genes heterólogos e vetores de terapia gênica.

Documentação e informatização

Sistema utilizado: Infomicro.

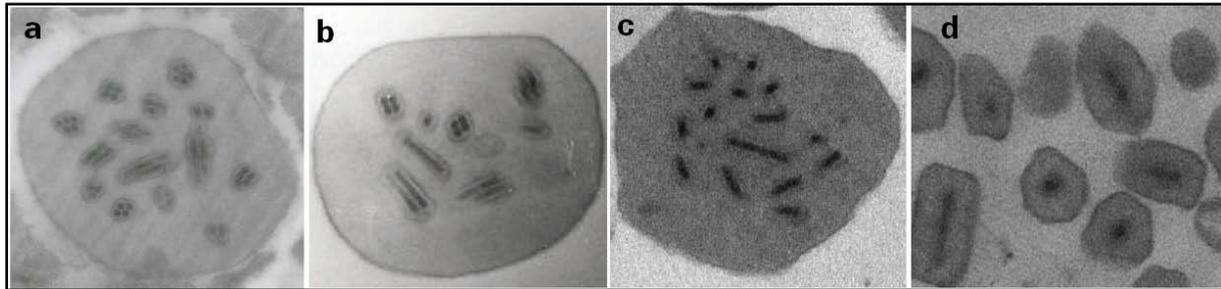


Figura 1. Micrografia eletrônica de corpos de oclusão (OBs), MNPV (a,b), SNPV (c) e GV (d).

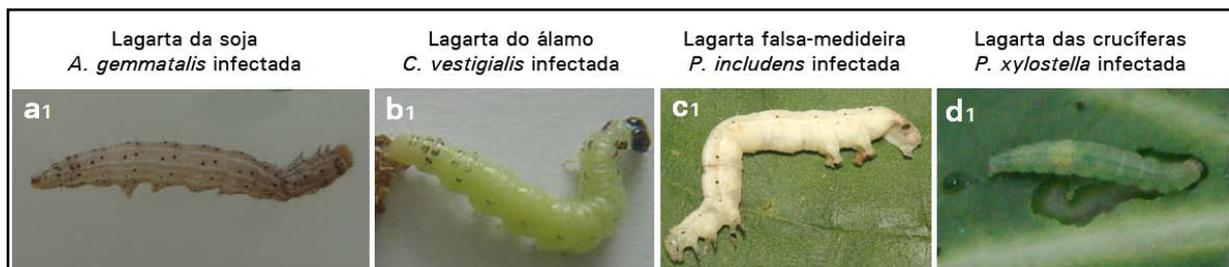


Figura 2. Baculovírus isolados de diferentes insetos infectados.

Vírus de suínos e aves – Coleção de micro-organismos de interesse para a suinocultura e avicultura (CMISEA)

Coleta de amostras

A coleta de material tem por finalidade a obtenção de material para isolamento ou caracterização dos agentes microbianos envolvidos nas mais diversas manifestações clínicas.

Importância

A coleta é essencial para a posterior análise e utilização dos micro-organismos isolados. Sem a coleta de micro-organismos não é possível realizar um estudo detalhado de cada agente nem aprofundar o entendimento dos diversos agentes infecciosos nas diferentes patologias.

Procedimento

Realiza-se a coleta de micro-organismos (vírus e bactérias) que compõem o CMISEA por meio de necropsia ou via “swab” (ocular, oral, nasal, retal, de carcaça) de animais infectados.

Isolamento e multiplicação viral

Os vírus estudados na Embrapa Suínos e Aves são isolados e multiplicados por meio da inoculação de tecido suspeito macerado com tampão e antibióticos em ovos embrionados (vírus de aves), ou em células de linhagem (vírus de suínos).

Purificação de partículas virais

As partículas virais podem ser purificadas a partir de ultracentrifugação em gradiente de césio, sacarose, etc. A escolha do gradiente vai depender do vírus em questão.

Manipulação: meios de cultivo

- Ovos *Specific Pathogen Free* (SPF) embrionados.
- Linhagens celulares.

Exames ao microscópio eletrônico de luz (MET: transmissão; MEV: varredura) – Importância e aplicações

A utilização de microscopia, seja de transmissão ou de varredura, é uma importante ferramenta utilizada visando à identificação viral. A partir de tais procedimentos, é possível ao virologista ter uma imagem das características morfológicas das partículas virais identificadas. Uma importante limitação de tais técnicas que se deve ter em mente é o fato de que pode haver mais de um vírus identificado na mesma análise, o que pode gerar uma dificuldade a mais no momento da interpretação dos dados.

Testes de infectividade *in vivo*

Na Embrapa Suínos e Aves, são muito importantes e muito empregados testes de infecção viral *in vivo*. Tal teste é extremamente importante para a avaliação das características de patogenicidade dos diversos vírus estudados na Unidade.

Caracterização

Definição

O processo de caracterização viral consiste em analisar características morfológicas, físico-químicas, bioquímicas e moleculares dos diferentes vírus em questão.

Importância

A caracterização viral é um procedimento que fornece aos virologistas importantes informações sobre as características das amostras virais isoladas ao longo do tempo, sendo subsídio para tomadas de decisões sanitárias ou para o desenvolvimento de imunobiológicos (testes de diagnóstico, vacinas) eficientes no controle das diferentes infecções virais.

Análise bioquímica

Por meio dessa análise, é possível avaliar o grau de variabilidade dos diferentes vírus isolados. Abaixo, há exemplos de metodologias utilizadas para a execução desse tipo de análise.

- Análise de proteínas virais mediante gel SDS-PAGE.
- Identificação/relação sorológica por meio de Gel Imunodifusão (AGP), ELISA, *Western blot*.

Análise molecular

As análises moleculares são utilizadas com o objetivo de detectar o genoma viral em tecidos estudados, bem como avaliar as diferenças encontradas no genoma das amostras virais isoladas ao longo dos anos. Abaixo, há exemplos de metodologias utilizadas para a análise molecular de vírus.

- Análise de restrição de DNA.
- Clonagem de fragmentos de DNA.
- Análise por PCR (*Polymerase Chain Reaction*).
- Sequenciamento.
- Análise filogenética.

Preservação

Os micro-organismos pertencentes ao CMISEA são acondicionados, principalmente, como apresentado na tabela abaixo. A maioria dos micro-organismos pode, ainda, ser estocada após o processo de liofilização; porém, o congelamento a partir de -70°C e, especialmente, em nitrogênio líquido parece ser a melhor opção.

Forma	Agente	Temperatura
Congelamento	Vírus Envelopados	-70°C
	Vírus Não Envelopados	-20°C
	Vírus em geral	Nitrogênio líquido
	Bactérias	-70°C

Envio de amostras (transporte)

O transporte de amostras é uma atividade que ainda não está sendo realizada pelo CMISEA; porém, usualmente amostras de vírus e bactérias são transportadas congeladas, acondicionadas juntamente com gelo seco ou nitrogênio líquido.

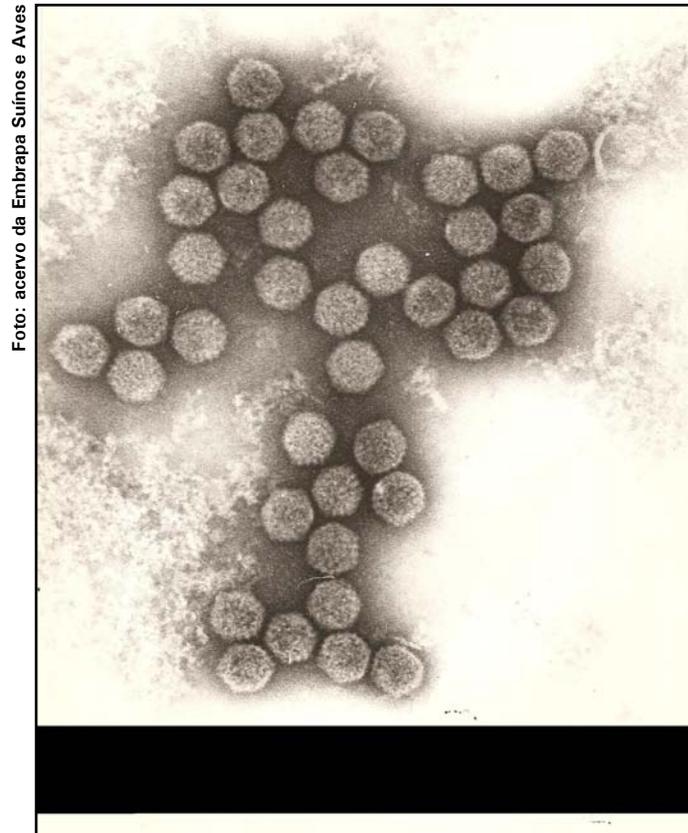


Figura 3. Micrografia eletrônica de vírus da doença de Gumboro em aves.

Referências

- CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997.
- CARSTENS, E. B.; BALL, L. A. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 154, n. 7, p. 1181-1188, 2009.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Fields Virology**. 3th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, 1997. V. 2.
- HERNIOU, E. A.; ARIF, B. M.; BECNEL, J. J.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; HARRISON, R.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; VLAK, J. M. Baculoviridae. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.) **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. Elsevier Academic Press, 2011. p. 163-173. (Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses).
- HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 8, p. 1043-1050, 2007.
- JEHLE, J. A.; LANGE, M.; WANG, H.; HU, Z.; WANG, Y.; HAUSCHILD, R. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. **Virology**, [S. l.], v. 346, p. 180-193, 2006.
- KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. [S. l.]. Elsevier Academic Press, 2011. 1272 p. (Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses).
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, p. 680-685, 1970.
- MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The Biology of Baculovirus**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986. V. 1. p. 129-146.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3th ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 1999. 629 p.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York: W. H. Freeman and Company, 1992. 347 p.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Cold Spring Harbor, New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; SIHLER, W.; RIBEIRO, M. Z. A.; MOSCARDI, F. **Metodologias para caracterização de vírus de insetos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 13 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 13).



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*