

CURSO DE VIROLOGIA BÁSICA

Elaborado pelo Prof. Dr. **Paulo Michel Roehle**
(Com a participação de alunos de graduação de vários cursos)

EQUIPE DE VIROLOGIA

Laboratório de Virologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS
Rua Sarmiento Leite, 500 – Sala 208
Porto Alegre, RS – CEP 90.050 – 170
Fone (51) 3308 3655
&
FEPAGRO Saúde Animal,
Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF),
Estrada do Conde 6000,
Eldorado do Sul, RS - CEP 92.990 - 000
Fone (51) 3481 3711
E-mail: proehle@gmail.com

CONTEÚDO DESTA POLÍGRAFO:

OBJETIVO

LITERATURA RECOMENDADA

HISTÓRICO DA VIROLOGIA E PRINCÍPIOS DE VIROLOGIA BÁSICA

MÉTODOS EM VIROLOGIA

PATOGENIA DAS VIROSES

TRANSMISSÃO

PENETRAÇÃO NO ORGANISMO

MULTIPLICAÇÃO E DISSEMINAÇÃO NO HOSPEDEIRO

INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE INFECÇÕES VIRAIS

MULTIPLICAÇÃO VIRAL

ESTÁGIOS DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL

CLASSIFICAÇÃO DOS VÍRUS

FAMÍLIAS DE VÍRUS ANIMAIS

CARACTERÍSTICAS DAS FAMÍLIAS DE VÍRUS COM GENOMA DE RNA

CARACTERÍSTICAS DAS FAMÍLIAS DE VÍRUS COM GENOMA DE DNA

AGENTES NÃO CONVENCIONAIS (PRÍONS)

OBJETIVO

Este material de estudo tem o objetivo de servir como texto básico para as disciplinas onde a virologia faz parte do currículo. Foi preparado com a colaboração de muitos estudantes que trabalharam (ou ainda trabalham) junto ao Laboratório de Virologia, ou freqüentaram as aulas de virologia em determinado momento. O texto foi elaborado visando a familiarização do aluno com o papel dos vírus na natureza, em particular daqueles que causam doenças aos homens e animais.

LITERATURA RECOMENDADA [e observações]:

Fields Virology (2005) Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B & Straus SE (eds). Fifth edition. Lippincott-Raven. [Este livro é a “Bíblia” da virologia; porém, muito extenso e complexo para estudos de graduação].

Virologia Veterinária (2007) E.F. Flores (org). [Excelente livro, com ótima parte básica, em português, e a parte especial dedicada aos vírus de interesse veterinário].

Manual of Clinical Microbiology (Publicado pela American Society of General Microbiology, última edição 1999). [Ótimo em métodos recentes de diagnóstico para virologia humana].

Human Virology: A Text for Students of Medicine, Dentistry, and Microbiology (Oxford Medical Publications) by Leslie Collier and John S. Oxford (Paperback - Oct 1, 1993).

Virology Methods Manual, First Edition by Hillar O. Kangro (Plastic Comb - Jan 15, 1996). [Ótimo para o laboratório].

Veterinary Virology, Frederick A. Murphy, E. Paul J. Gibbs, Marian C. Horzinek, and Michael J. Studdert (Hardcover - Oct 15, 1999).

Human Virology. Leslie Collier and John Oxford (Paperback - Jul 20, 2006).

Clinical Virology by Douglas D. Richman, Richard J. Whitley, and Frederick G. Hayden (Hardcover - May 2002).

Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology (LANGE Basic Science) by Geo. F. Brooks, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, and Geo. Brooks (Paperback - April 2, 2004) [Ou versões mais recentes].

Coleções específicas disponíveis na biblioteca do ICBS ou no Portal periódicos da CAPES:

Revistas e periódicos:

- Virology
- Intervirology
- Archives of Virology
- Journal of General Virology
- Advances in Virus Research
- Virus Research
- Science
- Nature
- e muitas outras !!!

Sites na Word Wide Web:

Sites de busca:

- Wikipedia; [Muito bom em todos os temas da virologia; muito útil].
- Google: [Digite: "All the Virology on the WWW" ou "ATV"].

Sites:

- www.tulane.edu/~dmsander/www/224/Replication224.html [site relacionado a replicação viral; dentro do "all the virology"]
- www.micro.msb.ac.uk
- www.umu.se/virology/alistair [Site com jogos interativos sobre virologia]
- <http://duke.usask.ca> [Cursos de virologia, etc, etc]
- <http://life.anu.edu.au/viruses/welcome.htm>

Obs.: Outros sites foram incluídos nos capítulos apropriados, quando possível.

Aula 1- HISTÓRICO DA VIROLOGIA // PRINCÍPIOS DE VIROLOGIA BÁSICA

ATENÇÃO: CONSULTE O SITE: *Introduction to Molecular Virology* - Preparado por Ed Rybicki, Department of Microbiology at the University of Cape Town, South Africa. www.uct.ac.za/microbiology/tutorial/virtut1.html

OBJETIVOS:

Ao final destas aulas o aluno será capaz de:

- Reconhecer alguns dos momentos históricos importantes da virologia;
- Reconhecer quais os métodos mais comumente empregados para o estudo, isolamento e multiplicação viral;
- Definir o que é um vírus e identificar seus componentes essenciais;
- Compreender que existem vírus em praticamente todas as espécies, sendo apenas alguns deles patogênicos.

HISTÓRICO

- Século X A.C.: China: varíola (casos pouco documentados, tentativas de imunização com crostas).
- Século XIV - Holandês voador: Os navios singrando os mares sem tripulação – poderiam ser causados por episódios de febre amarela.
- O velho marinheiro: outra história em que os vírus desempenham papel.
- Raiva: desde o tempo dos faraós - cães mordendo pessoas em desenhos nas pirâmides.
- Século XVIII - Jenner: por volta de 1798: se torna o pai da vacinação => vacina James Phipps com suspensão de crostas de “cowpox”.
- Beijerinck (1899): com o vírus do Mosaico do Fumo – demonstra que são agentes filtráveis e transmissíveis. - é considerado o "pai da virologia".
 - Transmissão com filtrados:
 - "Humores malignos" (= vírus)
 - "contagium vividum fluidum"
- Loeffler & Frosch (1898): (um pouco antes de Beijerinck, mas não tão bem documentado): demonstraram a filtrabilidade do vírus da febre aftosa, primeiro vírus de mamíferos identificado.
- Ellerman & Bang (1908): descobriram que a leucose das aves é uma doença transmissível (causada por um retrovírus!).
- Rous (1911): descobriu o vírus do “Sarcoma das aves” (Sarcoma de Rous) (outro retrovírus!). Mais adiante, o mesmo Rous mostrou que um papilomavírus causava câncer de pele em coelhos.
- Stanley (1935): trabalhando com o vírus do mosaico do fumo, observou que em determinadas situações os vírus podiam ser cristalizados (e isso gerou um prêmio Nobel para ele, mas também muita confusão: seriam os vírus elementos de transição entre os reinos mineral e animal ?).

EXISTEM VÍRUS EM TODAS AS ESPÉCIES QUE TEM CÉLULAS:

- **Bactérias (bacteriófagos ou fagos)** – muito utilizados hoje em dia na biologia molecular para a transferência e expressão de genes;
- **Plantas** – uma infinidade de vírus afetam vegetais;
- **Animais** - ONDE SE CONCENTRA ESTE CURSO - neste pequeno número de vírus que causa doenças em animais, incluindo o homem, claro.

AFINAL, O QUE É UM VÍRUS ?

- a) São microorganismos que se **replicam sempre dentro de células vivas;**
- b) **Utilizam** (em maior ou menor grau) **o sistema de síntese das células;**
- c) **Induzem a síntese de proteínas capazes de transferir o genoma viral para outras células.**

UM VÍRUS COMPLETO = UM VÍRION = UMA PARTÍCULA VIRAL INFECCIOSA

ESTRUTURA DOS VÍRUS:

- **Genoma ou Núcleo:** RNA ou DNA. Por vezes, o genoma está envolto em uma camada de proteínas distinta do capsídeo.
- **Capsídeo** (formado por capsômeros) O conjunto de núcleo mais capsídeo é denominado **nucleocapsídeo**.
- **Envelope** (glicoproteínas -> peplômeros). Muitas vezes as glicoproteínas formam "espículas" (projeções a partir do envelope)

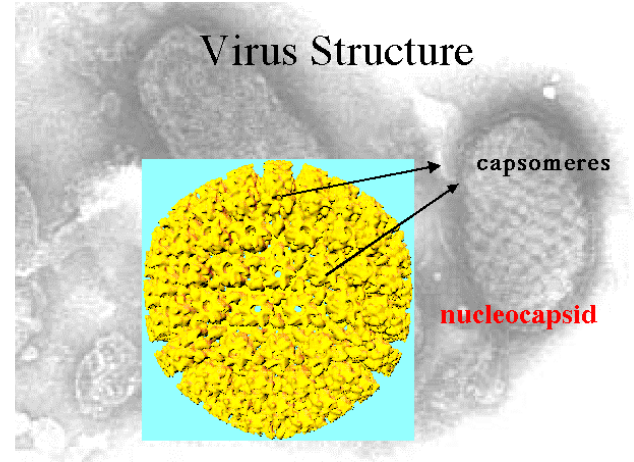


Foto-montagem do Dr. Vikram Misra,
Saskatchewan Vet
Med School, Canadá.

TIPOS DE ACIDO NUCLÉICO VIRAL:

- FITA SIMPLES de DNA (fsDNA);
- FITA DUPLA de DNA (fdDNA);
- FITA SIMPLES de RNA (fsRNA);
- FITA DUPLA de RNA (fdDNA).

Os vírus que tem seu genoma composto por uma **fita simples de RNA** pode ainda ser subdivididos em:

- Vírus cujo genoma tem a mesma orientação do mRNA, chamado genoma de polaridade positiva, ou simplesmente genoma de fita simples positiva;
- Vírus cujo genoma tem a orientação inversa do mRNA, chamados de polaridade negativa, ou genoma de fita simples negativa.

O CAPSÍDEO VIRAL:

Composição essencialmente protéica. Composto por um número variável de proteínas. Alguns vírus: possuem uma "matriz" protéica, que preenche o espaço entre o genoma e o envelope (ex. herpesvírus, paramixovírus). Esta matriz, também protéica, exerce funções variáveis dentro da multiplicação ou encapsidação viral.

SIMETRIA DO NUCLEOCAPSÍDEO:

- **Icosaédrica ou cúbica:** picornavírus, parvovírus, adenovírus;
- **Helicoidal** : rhabdovírus, filovírus, bunyavírus;
- **Complexa:** somente os poxvírus, mais complexos do que os demais.

Precisamos também saber um pouco sobre quais as

MEDIDAS COMUMENTE USADAS EM VIROLOGIA:

- MICRON (μ) = 1/1000 mm (10^{-3} mm)
- NANÔMETRO (nm) = 1/1000 000 mm (10^{-6} mm)
- ÂNGSTROM = 1/10 000 000 mm (10^{-8} mm)
- DALTON (x 1000= kiloDalton, kDa) = 1.66×10^{-24} g

Características gerais, estrutura e taxonomia viral

Extraído de: http://www.ivis.org/advances/carter/part1chap1_pt/chapter.asp?la=7

In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 6-Dec-2004; A3401.1204.PT

D.J. Wise¹, G.R. Carter² and E. F. Flores³

1- Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

2- Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

3- Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil.

Traduzido por: E. F. Flores, Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil. (17-Jun-2005).

Índice

- Generalidades
- Estrutura viral
- Taxonomia viral
- Glossário

Generalidades

- Os vírus são os menores e mais simples microorganismos que existem.
- São muito menores que células eucariotas e procariotas.
- Ao contrário destas, possuem uma estrutura simples e estática.
- Não possuem metabolismo próprio.
- Dependem da maquinaria celular para a sua replicação (parasitas intracelulares obrigatórios).
- Possuem DNA ou RNA como genoma, mas não possuem ribossomas e outros fatores necessário para a produção de proteínas. Por isso necessitam das funções e do metabolismo celular para produzir suas proteínas e se multiplicar.
- O genoma viral, ácido ribonucleico (RNA) ou deoxiribonucleico (DNA), codifica as informações mínimas para: 1. Assegurar a sua replicação; 2. Empacotar o seu genoma e 3. Subverter funções celulares em seu benefício.
- Alguns vírus infectam células procariotas (bacteriófagos); outros infectam células eucariotas.
- Alguns vírus destroem as células infectadas, produzindo enfermidades; outros persistem em estado latente ou persistente na célula; e outros podem causar transformação tumoral nas células infectadas.

Estrutura viral

Os vírus são compostos, pelo menos, do genoma de ácido nucleico RNA ou DNA e uma cobertura de proteínas. Muitos vírus possuem uma membrana externa adicional denominada envelope.

- A cobertura protéica ou capsídeo de um vírion (virus completo ou partícula vírica) é composta de cópias múltiplas de uma ou mais tipos de proteínas. Essas proteínas se associam entre si, formando unidades estruturais denominadas capsômeros.
- O conjunto do genoma mais o capsídeo de um vírion é denominado de nucleocapsídeo.
- Os vírus mais simples não possuem envelope e possuem RNA ou DNA de cadeia simples (Fig. 1.1).
- Os vírus envelopados contêm uma membrana externa que recobre o nucleocapsídeo (Fig.1.2). Essa membrana externa (ou envelope) é derivada de membranas da célula hospedeira (nuclear, do aparelho de Golgi, do retículo endoplasmático ou membrana plasmática). Assim como essas

membranas, o envelope é constituído de uma membrana lipídica dupla com proteínas nela inseridas. As proteínas do envelope viral são codificadas pelo seu genoma.

- Alguns vírus, como os bacteriófagos, possuem caudas protéicas complexas que são necessárias para a ancoragem e introdução do genoma viral na célula hospedeira.

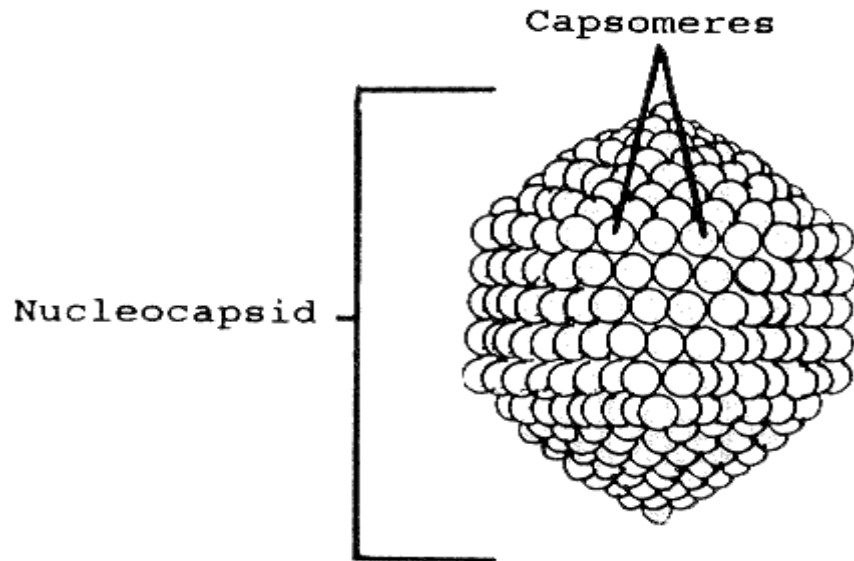


Figura 1-1. Vírion sem envelope, com capsídeo icosaédrico. O ácido nucléico localiza-se no interior do capsídeo. Ilustração cortesia de A. Wayne Roberts.

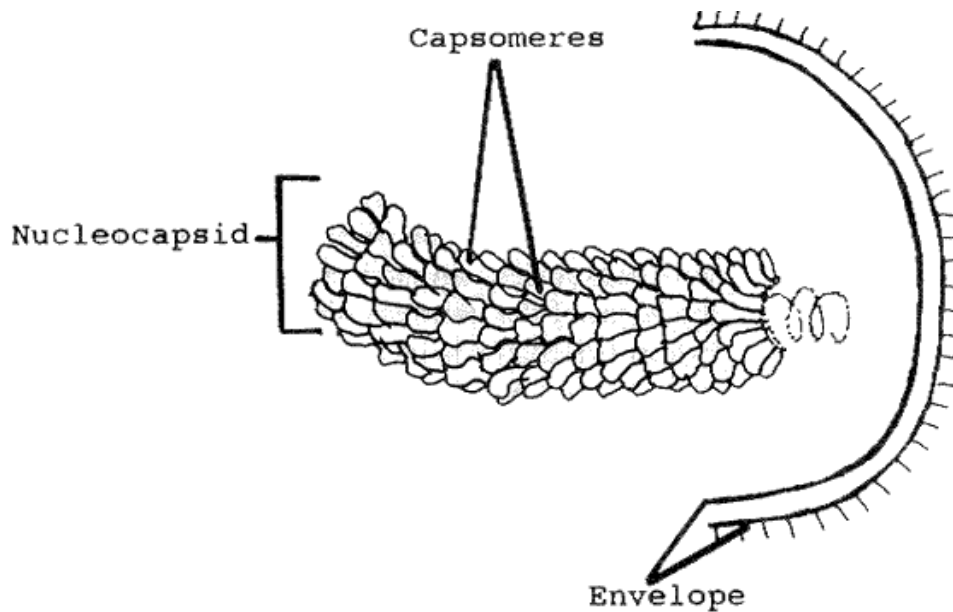


Figura 1-2. Vírion envelopado, com capsídeo helicoidal. O ácido nucléico localiza-se no interior do vírion, como indica a linha pontilhada em forma de espiral. As linhas na superfície externa do envelope representam espículas glicoprotéicas. Ilustração cortesia de A. Wayne Roberts.

O genoma viral

O genoma dos vírus é constituído de DNA ou RNA. Nenhum vírus contém DNA e RNA simultaneamente. O DNA pode ser de fita simples (parvovirus e circovirus), fita dupla (poliomavirus, adenovirus, herpesvirus) ou fita dupla parcial (hepadnavirus). O genoma DNA pode ter as suas extremidades

covalentemente ligadas entre si (genoma circular – poliomavirus e circovirus) ou possuir as extremidades livres (linear – adenovirus, herpesvirus, parvovirus). O genoma dos poxvirus é DNA de fita dupla linear e possui as extremidades ligadas entre si.

Todos os genomas virais de RNA são lineares. A maioria deles é RNA de fita simples, poucos possuem RNA de fita dupla (reovirus, bornavirus). A maioria dos genomas RNA possui um único segmento (monopartite), enquanto alguns possuem o genoma dividido em dois segmentos (arenavirus), três (bunyavirus), 7 ou 8 (otomyxovirus) ou 10 segmentos (reovirus). Os genomas RNA de fita simples podem ser classificados em:

- RNA de sentido positivo (RNA +): se o RNA genômico serve de RNA mensageiro e é traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira.
- RNA de sentido negativo (RNA -): se o RNA genômico é complementar ao RNA que é traduzido, e por isso não pode ser traduzido diretamente pelos ribossomos.
- Nos arenavirus e bonyavirus, um segmento do RNA genômico (sentido negativo) é transcrito e origina cópias de RNA de sentido positivo (que funcionam como RNA mensageiro). No entanto, cópias destes RNAs (que seriam de sentido negativo) também servem de mensageiros e são traduzidas. Essa estratégia é denominada de ambissense.

O genoma dos vírus pode codificar desde poucas proteínas diferentes (Polyomavirus, 6 a 7 genes, 5000 nucleotídeos de extensão) até mais de 70 - 100 produtos gênicos (herpesvirus, 60 a 120 genes, 120.000 a 220.000 pares de bases de extensão). Em geral, o genoma dos vírus RNA são menores, atingindo uma extensão máxima de pouco mais de 30.000 nucleotídeos (Coronavirus). Uma hipótese para explicar isto seria a de que as polimerases virais de RNA tendem a cometer mais erros do que as polimerases de DNA no processo de replicação do genoma. Assim, a fidelidade de replicação poderia limitar o tamanho do genoma. Ao contrário, os genomas de vírus DNA podem atingir mais de 300.000 pares de bases, como se observa em alguns herpesvirus.

O capsídeo

A função do capsídeo é empacotar e proteger o genoma viral durante a sua transferência entre células e hospedeiros. O capsídeo pode ser formado por cópias múltiplas de uma mesma proteína ou por uma associação de várias proteínas diferentes. Os capsídeos construídos por cópias de uma única proteína representam um exemplo de economia genética, pois apenas um gene pode codificar os produtos necessários para construir o capsídeo e recobrir completamente o genoma.

- O capsídeo de um vírus pode possuir várias formas geométricas que são características de cada família viral. Essas incluem:
 - Capsídeo icosaédrico sem envelope (picornavirus, polyomavirus); ou envelopado (herpesvirus). Essa forma geométrica possui várias faces triangulares e ângulos (Fig. 1.1.); o número de faces e ângulos pode variar de acordo com o número e tipo de associação entre as proteínas estruturais constituintes.
 - Capsídeo helicoidal, sem envelope (virus do mosaico do tabaco) ou envelopado (rabdovirus, paramyxovirus), (Fig. 1.1 e Fig. 1.2.).
- Os vírus variam de tamanho, desde os circovirus com 17 - 22 nm de diâmetro, até os poxvirus, que podem atingir os 300 nm. Esses vírus possuem uma forma ovóide e são suficientemente grandes para serem visíveis sob microscopia ótica, ao contrário dos demais cuja visualização requer microscopia eletrônica.
- Várias técnicas têm sido utilizadas para a visualização dos vírus. A cristalografia de raios X é utilizada para determinar a estrutura física, assim como as dimensões e morfologia das proteínas e estruturas componentes da partícula vírica. As informações obtidas pelo uso dessa técnica são utilizadas para construir um modelo da estrutura da partícula viral. A microscopia eletrônica é utilizada para determinar-se a morfologia dos vírus e também com fins diagnósticos para a detecção de vírus em amostras clínicas. No capítulo 2 são descritos com detalhes os métodos utilizados para a visualização de virus.

Cinco formas estruturais básicas

De acordo com a sua morfologia, existem cinco tipos básicos de estrutura de partículas víricas, citadas a seguir com exemplos:

- Icosaédrico sem envelope: adenovirus e picornavirus.

- Helicoidal sem envelope: vírus do mosaico do tabaco; não se conhece vírus humanos ou animais com essa estrutura.
- Icosaédrico com envelope: togavirus e flavivirus.
- Helicoidal com envelope: rabdovirus e paramyxovirus.
- Complexos: bacteriófagos e poxvirus.

Envelope

O envelope viral, presente em vírus de algumas famílias, origina-se de membranas da célula hospedeira através de brotamento, que ocorre durante o egresso de vírions maduros da célula hospedeira. Essa membrana frequentemente é derivada de uma região da membrana plasmática, mas pode originar-se também das membranas do aparelho de Golgi, do retículo endoplasmático ou da membrana nuclear, dependendo do vírus e do compartimento celular onde ocorre a replicação. Independentemente de sua origem, o envelope é composto de uma camada dupla de lipídios – de origem celular – com proteínas associadas. As proteínas do envelope são codificadas pelo vírus e constituem-se em sua maioria de glicoproteínas. O número de proteínas do envelope pode variar de uma até mais de dez, dependendo do vírus. As glicoproteínas do envelope desempenham várias funções, incluindo a ancoragem inicial do vírion na célula, penetração, fusão e disseminação do vírus entre células. A ancoragem inicial do vírion na superfície da célula requer que o envelope esteja intacto e que as glicoproteínas estejam em sua conformação natural. Algumas drogas antivirais são dirigidas contra as proteínas do envelope e podem reduzir a capacidade dos vírus de se ligarem na célula e iniciarem a infecção, reduzindo assim a sua infectividade.

O processo de brotamento e a conseqüente aquisição do envelope por vírions recém-formados podem ou não resultar na destruição da célula infectada. A liberação de um número muito grande de vírus simultaneamente pode comprometer a integridade celular e resultar na morte da célula. Muitas vezes, a liberação da progênie viral é lenta e resulta em excreção viral contínua e infecção crônica ou persistente. Ao contrário dos vírus sem envelope, cuja liberação é quase sempre acompanhada de morte celular, o egresso de vírus envelopados é muitas vezes compatível com a sobrevivência da célula hospedeira. Portanto, o processo de brotamento representa um mecanismo de liberação de progênie viral sem induzir morte celular.

Proteínas virais

O genoma dos vírus codifica dois tipos de produtos: as proteínas estruturais e as não-estruturais. As proteínas estruturais são aquelas que fazem parte da estrutura física da partícula vírica (capsídeo, envelope), enquanto as proteínas não-estruturais são produzidas dentro da célula infectada e desempenham diferentes funções na replicação viral. O número de proteínas codificadas pelos vírus varia amplamente, desde poucas até centenas.

As proteínas estruturais incluem aquelas que fazem parte do capsídeo e associam-se e empacotam o genoma viral. Em alguns vírus envelopados, existe uma camada protéica denominada tegumento entre o capsídeo e o envelope. As proteínas que compõem o tegumento também são estruturais. As proteínas da superfície do capsídeo e do envelope são ligantes, que interagem com receptores na superfície da célula hospedeira. Algumas dessas proteínas (as glicoproteínas) são processadas no lúmen do retículo endoplasmático, onde resíduos de açúcar (oligossacarídeos) são incorporados à cadeia polipeptídica. Essas proteínas são enviadas ao aparelho de Golgi, a vesículas secretoras e finalmente se fusionam com a membrana plasmática, podendo estar presentes na superfície da célula infectada. As glicoproteínas do envelope desempenham papel importante nas interações entre os vírions e as células (ligação, penetração, fusão, disseminação entre células) e são alvos importantes para anticorpos neutralizantes produzidos pelo hospedeiro.

As proteínas estruturais são principalmente enzimas, como aquelas envolvidas no processo de transcrição do genoma, replicação e processamento de proteínas. Um exemplo de proteína não-estrutural é a transcriptase reversa dos retrovírus, que produz cópias de DNA a partir de um molde RNA para serem incorporadas ao genoma da célula hospedeira. Alguns vírus codificam várias proteínas não-estruturais que desempenham papéis acessórios na regulação da expressão gênica celular e viral, regulação das várias etapas do ciclo replicativo do vírus, neutralização dos mecanismos de defesa do hospedeiro, transformação celular, entre outras.

Outros componentes dos vírions

Lipídios

Os lipídios presentes nas partículas víricas envelopadas são derivadas das membranas celulares. São, em sua maioria fosfolipídios (50 - 60%) e o restante é colesterol. O envelope dos vírus contém lipídios derivados das membranas celulares e proteínas codificadas pelo vírus, as vezes formando projeções (espículas). A composição lipídica total dos vírus envelopados representa aproximadamente 25 a 30% do seu peso seco. O restante é formado pelo genoma e parte protéica.

Carboidratos

Os carboidratos estão presentes essencialmente na forma de oligossacarídeos nas glicoproteínas, glicolipídios e mucopolissacarídeos. A composição de carboidratos corresponde aproximadamente àquela da célula hospedeira. No entanto, as glicoproteínas freqüentemente contêm uma ligação glicosídica N- ou O-. Os carboidratos encontram-se principalmente no envelope. Alguns vírus complexos contêm glicoproteínas internas ou proteínas glicosiladas também no capsídeo.

Taxonomia Viral

Os vírus constituem um grupo numeroso e heterogêneo. São classificados em categorias hierárquicas baseadas em várias características. A classificação é dinâmica, já que novos vírus estão sendo continuamente descobertos; e novas informações se acumulam sobre os vírus já conhecidos. A classificação e nomenclatura utilizadas neste texto estavam atualizadas até a sua submissão. As alterações mais recentes podem ser verificadas em informativos periódicos do Comitê Internacional para Taxonomia Viral (ICTV). (Disponível em amazon.com).

O esquema básico de classificação hierárquica é: Ordem - Família - Subfamília - Espécie - Cepa / Tipo. Determinadas características virais definem cada uma dessas categorias taxonômicas. As Ordens possuem o sufixo: virales; as famílias possuem o sufixo: viridae; e os gêneros e espécies: virus. Uma espécie de vírus é representada por uma linhagem replicativa que ocupa um nicho ecológico, por exemplo, uma enfermidade particular.

Os vírus são classificados em famílias com base em muitas características. Uma característica básica é o tipo de ácido nucléico (DNA ou RNA) e a morfologia, ou seja, o tamanho e forma do vírion, assim como a presença ou não do envelope. O espectro de hospedeiros e as propriedades imunológicas (sorotipos) também são utilizados. Propriedades físico-químicas como massa molecular, densidade, inativação térmica, estabilidade ao pH e sensibilidade a solventes também são utilizados na classificação viral.

Alguns aspectos importantes na taxonomia atual são o tipo de ácido nucléico, se o genoma possui cadeia dupla ou simples, a organização dos genes no genoma e a presença de determinados genes. Essas características são utilizadas para classificarem-se os vírus em ordens ou famílias. Por exemplo, a ordem Mononegavirales está composta pelos vírus que possuem o genoma RNA de fita simples, polaridade negativa. Finalmente, a classificação se baseia nas macromoléculas produzidas (proteínas estruturais e enzimas), propriedades antigênicas e propriedades biológicas (infectividade, capacidade hemaglutinante, etc.). As várias famílias são ordenadas no sumário de acordo com as diversas características de seu ácido nucléico. Neste polígrafo, as famílias são apresentadas utilizando a mesma ordem apresentada na tabela a seguir. A tabela 1.1 apresenta informações básicas sobre cada uma das principais categorias taxonômicas virais.

Tabela 1.1. Classificação e Características Básicas de Vírus de Vertebrados				
vírus DNA de cadeia simples				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do vírion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Circoviridae	Icosaédrica; 17-25		Circovirus	vírus da doença do bico e das penas
			Gyrovirus	Anemia infecciosa das galinhas
Parvoviridae	Icosaédrica; 18-26	Parvovirinae	Parvovirus	Parvovirus canino e felino
			Erythrovirus	vírus B19
			Dependovirus	vírus 2 adeno-associado
			vírus ADMV-like	vírus da doença aleutian de martas
			vírus BPV-like	Parvovirus bovino

Virus DNA de cadeia dupla				
Familia	Simetria do capsídeo e diâmetro do vírion (nm)	Subfamilia	Gêneros	Espécies representativas
Poxviridae	Complexa; 140-260 a 220-450	Cordopoxvirinae	Orthopoxvirus	virus da vacina da varíola
			Parapoxvirus	Orf virus
			Avipoxvirus	virus da varíola aviária
			Capripoxvirus	virus da varíola ovina
			Leporipoxvirus	virus do mixoma
			Suidpoxvirus	virus da varíola suína
			Molluscipoxvirus	virus do molusco contagioso
			Yatapoxvirus	virus tumoral dos macacos de Yaba
Herpesviridae	Icosaédrica; 120-200	Alfaherpesvirinae	Simplexvirus	virus do herpes simplex 1
			Varicellovirus	virus da varicela zoster
			Marek's disease-like virus	Herpesvirus galideo 2
			Laringo-traqueíte virus	Herpesvirus galideo 1
		Betaherpesvirinae	Cytomegalovirus	Herpesvirus humano 5
			Muromegalovirus	Cytomegalovirus murino 1
			Roseolovirus	Herpesvirus humano 6
		Gammaherpesvirinas	Lymphocryptovirus	virus Epstein-Barr
			Rhadinovirus	Herpesvirus ovino 2
		Polyomaviridae	Icosaédrica; 40-45	
Papillomaviridae	Icosaédrica; 52-55		Papillomavirus	Papilomavirus bovino 1
Adenoviridae	Icosaédrica; 80-110		Mastadenovirus	Adenovirus bovino
			Aviadenovirus	Adenovirus aviário A
			Atadenovirus	Adenovirus ovino D
			Siadenovirus	virus da enterite hemorrágica dos perus
Asfaviridae	Complexa; 175-215		Asfivirus	virus da peste suína africana
Iridoviridae	Icosaédrica; 125-300		Ranavirus	virus das rãs 3
			Lymphocystisvirus	virus da doença linfocítica 1

virus DNA e RNA que realizam transcrição reversa				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do vírion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Hepadnaviridae	Icosaédrica; 42-47		Orthohepadnavirus	virus da hepatite B
			Avihepadnavirus	virus da hepatite B dos patos
Retroviridae	Icosaédrica; 80-100		Alfaretrovirus	virus da leucose aviária
			Betaretrovirus	virus da adenomatose pulmonar ovina
			Gammaretrovirus	virus da leucemia felina
			Deltaretrovirus	virus da leucose bovina
			Epsiloretrovirus	virus do sarcoma cutâneo de Walley
			Lentivirus	virus da imunodeficiência felina
			Spumavirus	Espuma vírus os bovinos

virus RNA de cadeia dupla				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do virion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Reoviridae	Icosaédrica; 60-80		Orthoreovirus	Orthoreovirus dos mamíferos
			Orbivirus	virus da língua azul
			Rotavirus	Rotavirus A
			Coltivirus	virus da febre dos carrapatos do Colorado
			Aquareovirus	Aquareovirus A
Birnaviridae	Icosaédrica; 60-70		Aquabirnavirus	virus da pancreatite infecciosa
			Avibirnavirus	virus da bursite infecciosa das aves

virus RNA de cadeia simples, polaridade negativa				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do virion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Paramyxoviridae	Helicoidal; 150-200 a 1000-10,000	Paramyxovirinae	Respirovirus	virus da parainfluenza bovina 3
			Rubulavirus	Rubulavirus suíno
			Morbilivirus	virus da cinomose; e do sarampo
			Henipavirus	virus Hendra
			Avulavirus	virus da doença de Newcastle
		Pneumovirinae	Pneumovirus	virus sincicial respiratório humano e bovino
			Metapneumovirus	Pneumovirus aviário
Rhabdoviridae	Helicoidal; 45-100 a 100-430		Vesiculovirus	virus da estomatite vesicular
			Lyssavirus	virus da raiva
			Ephemerovirus	virus da febre efêmera de bovinos
			Novirhabdovirus	virus da hematopoiese necrótica infecciosa
Orthomyxoviridae	Helicoidal; 80-129 a 2000		Influenzavirus A	virus da influenza (gripe) tipo A
			Influenzavirus B	virus da influenza tipo B
			Influenzavirus C	virus da influenza tipo C
			Thogotovirus	virus Thogoto
			Isavirus	virus da anemia infecciosa dos salmões
Bunyaviridae	Helicoidal; 80-100		Orthobunyavirus	virus de Akabane
			Hantavirus	virus Hantaan
			Nairovirus	virus da doença de ovelhas de Nairobi
			Phlebovirus	virus da febre do Vale Rift
Bornaviridae	Icosaédrica; 100-130		Bornavirus	virus da doença de Borna
Arenaviridae	Helicoidal; 50-300		Arenavirus	virus da coriomeningite linfocítica
			Deltavirus	virus da hepatite D

virus RNA de cadeia simples, polaridade negativa				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do vírion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Filoviridae	Helicoidal; 80 x 1400		Marburg-like virus	virus Marburg
			Ebola-like virus	virus Ebola

virus RNA de cadeia simples, polaridade positiva				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do vírion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Picomaviridae	Icosaédrica; 22-30		Enterovirus	virus da poliomielite
			Rhinovirusírus	virus do resfriado
			Cardiovirus	virus da encefalomiocardite
			Aphtovirus	virus da febre aftosa
			Hepatovirus	virus da hepatite A
			Parechovirus	Parechovirus humano
			Erbovirus	virus da rinite eqüina A
			Kobuvirus	virus Aichi
Caliciviridae	Icosaédrica; 35-39		Lagovirus	virus da doença hemorrágica dos coelhos
			Norovirus	virus Norwalk
			Sapovirus	Calicivirus suíno
			Vesivirus	virus do exantema vesicular de suínos
Astroviridae	Icosaédrica; 27-30		Mamastrovirus	Astrovirus humano
			Avastrovirus	Astrovirus do pavão
Coronaviridae	Helicoidal; 60-220		Coronavirus	virus da bronquite infecciosa das aves
			Torovirus	Torovirus eqüino
Arteriviridae	Icosaédrica; 40-60		Arterivirus	virus da arterite eqüina
Togaviridae	Icosaédrica; 70		Alphavirus	virus Sindbis
			Rubivirus	virus da rubéola

virus RNA de cadeia simples, polaridade positiva				
Família	Simetria do capsídeo e diâmetro do virion (nm)	Subfamília	Gêneros	Espécies representativas
Flaviviridae	Icosaédrica; 40-60		Flavivirus	virus da febre amarela
			Pestivirus	virus da diarreia viral bovina
			Hepacivirus	virus da hepatite C
Nodaviridae	Icosaédrica; 29-32		Betanodavirus	virus da necrose do gato rajado

Partículas víricas atípicas associadas com infecções:

Vírions defectivos

Os vírions defectivos ou incompletos são aqueles cujo genoma não possui um ou mais genes específicos, devido a mutação ou deleção. Por isso, são incapazes de completar o ciclo replicativo na célula. No entanto, se a célula for co-infectada com outro vírus – denominado vírus “helper” (auxiliar) o produto do gene ausente no vírus defectivo é complementado pelo vírus auxiliar e aquele pode replicar. Para alguns vírus, a quantidade de partículas incompletas ou defectivas produzidas é maior do que os vírions completos (até 1:1000). A produção de partículas defectivas é característica de algumas espécies de vírus e acredita-se que possa moderar a severidade da enfermidade clínica in vivo. Os virusóides, que são exemplos de vírus defectivos, serão discutidos a seguir nesse capítulo.

Pseudovírions

Pseudovírions podem ser produzidos durante a replicação viral, quando o genoma da célula hospedeira se fragmenta. Como resultado disso, segmentos de DNA celular são incorporados em partículas víricas, em substituição ao DNA viral. Esses pseudovírions podem ligar-se na célula hospedeira, penetrar, mas não são capazes de replicar, pois não possuem os genes virais necessários.

Prions

Os prions não são vírus. São partículas protéicas infecciosas associadas a encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) de humanos e animais. As TSEs incluem a doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD) em humanos, scrapie em ovinos e BSE em bovinos. Prions e TSEs são abordados com mais detalhes no capítulo 29. Resumidamente, o exame microscópico do cérebro revela grandes vacuolos nas regiões do córtex e cerebelo, daí a denominação de encefalopatia espongiforme. Exames mais detalhados das regiões afetadas revelam depósitos de fibrilas e placas amilóides associadas com a proteína prion. Essas enfermidades se caracterizam pela perda do controle motor, demência, paralisia e inevitavelmente morte. Maiores detalhes da patogenia ainda não são conhecidos.

Viróides

Os viróides são ácidos nucléicos de baixo peso molecular, desnudos, extremamente resistentes ao calor, a radiação ultravioleta e radiação ionizante. Essas partículas se compõem exclusivamente de um fragmento de RNA circular de cadeia simples, com algumas regiões de cadeia dupla. Os viróides causam, em sua maioria, doenças em plantas como a doença do tubérculo fusiforme da batata.

Virusóides

Os virusóides (também chamados de RNA satélites) são similares aos viróides, pois são segmentos de ácido nucléico de baixo peso molecular, extremamente resistentes ao calor e a radiações ultravioletas e ionizantes. No entanto, dependem de um vírus auxiliar para a sua replicação. Os virusóides replicam no citoplasma da célula, através de uma polimerase de RNA dependente de RNA.

Nova família de vírus – Mimiviridae

Mimiviridae é uma família viral que contém apenas um membro, Mimivirus. O nome do vírus é derivado do termo "micróbio imitador". O agente foi descoberto em 1992, infectando um protozoário e até o presente é o maior vírus que se conhece, com aproximadamente 400 nm de diâmetro. O capsídeo possui

forma icosaédrica, não possui envelope e o genoma é uma molécula de DNA de cadeia dupla de 1.2 Mb contendo aproximadamente 1260 genes. A seqüência completa do genoma do Mimivirus foi recentemente publicada (2004).

Glossário

Bacteriófago: vírus que infecta células procarióticas e possui muitas características de vírus de plantas e animais. Requer uma bactéria viva para realizar seu ciclo reprodutivo.

Brotamento: processo através do qual os vírus adquirem envelope. É precedido da inserção de glicoproteínas virais nas membranas da célula hospedeira. Esse processo ocorre mais freqüentemente na membrana plasmática e confere infectividade ao vírus.

Mucopolissacarídeo: uma classe de polissacarídeo como heparina, ácido hialurônico e sulfato de condroitina, que absorvem água para formar um material espesso, mucóide, gelatinoso.

Oligossacarídeo: um açúcar que contém um número pequeno e conhecido de unidades de monossacarídeos.

Obs.: Direitos reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento nº A3401.1204.PT.

MULTIPLICAÇÃO VIRAL

Os vírus seguem os mesmos princípios do dogma central da multiplicação biológica:



Alguns vírus podem se utilizar do processo reverso de transcrição (através da enzima transcriptase reversa) para originar "cópias" de DNA, a partir do RNA viral (ex. HIV).



Os hepadnavírus (ex. vírus da hepatite B) apresentam uma estratégia de multiplicação ainda mais incomum. Embora seu genoma seja de DNA, eles produzem novas cópias de DNA por transcrição reversa a partir do RNA gerado pelo vírus.



O mRNA é fundamental para produção de proteínas virais. Por isso, o mRNA é considerado a "chave" da multiplicação viral.

Um vírus RNA é dito de "polaridade positiva" quando seu genoma tem a mesma polaridade ou orientação do mRNA. Em outras palavras, seu genoma pode servir como mRNA e portanto, iniciar a síntese de proteínas. Vírus que possuem genoma de RNA "positivo" possuem o genoma infeccioso.

Porém, na natureza, nenhum genoma viral é de fato infeccioso, pois necessitamos um **vírião (partícula viral completa)**, para dar início a um ciclo replicativo. Como isto se explica?

Em condições de laboratório, é possível transferirmos o genoma de um determinado vírus para dentro de uma célula. Um vírus cujo genoma é constituído por RNA de polaridade positiva é capaz de iniciar um ciclo replicativo a partir deste genoma isolado. Já os vírus cujo genoma é formado por RNA de polaridade negativa necessitam carregar para dentro da célula uma **RNA polimerase RNA(viral)-dependente**, enzima esta que não encontra presente nas células e sem a qual não pode ser gerado o mRNA viral. Assim, somente com a introdução do genoma dentro de uma célula, não pode ter início um ciclo infeccioso. Portanto, esses vírus que contém genoma de RNA de polaridade negativa necessitam levar junto consigo essa enzima, a qual deve estar presente nos vírions, por ocasião da infecção.

ESTÁGIOS DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL (esquema geral)

1. ADSORÇÃO E PENETRAÇÃO PELO VÍRION
2. DESNUDAMENTO DO ACIDO NUCLÉICO VIRAL
3. SÍNTESE PRIMÁRIA DE mRNA
4. SÍNTESE PRIMÁRIA DE PROTEÍNAS VIRAIS
5. MULTIPLICAÇÃO DO GENOMA VIRAL
6. SÍNTESE TARDIA DE mRNA
7. SÍNTESE TARDIA DE PROTEÍNAS VIRAIS
8. MONTAGEM DE VÍRIONS NOVOS
9. LIBERAÇÃO DE VÍRIONS DA CÉLULA

Fases:

Primária ou "early" = período antes da replicação do ácido nucléico, ocorre a produção de proteínas não estruturais.

Tardia ou "late" => ocorre a produção de proteínas estruturais.

Replicação e genética viral

Extraído de: http://www.ivis.org/advances/Carter/Part1Chap3_pt/chapter.asp?LA=7

In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 8-Feb-2005; A3403.0205.PT

D.J. Wise¹ and G.R. Carter²

¹Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

²Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

Traduzido por: E. F. Flores y M. C. Speroto Brum, Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil. (17-Aug-2005).

Índice

- Replicação viral
 - Replicação de vírus DNA
 - Replicação de vírus RNA
- Genética viral
 - Mutação
 - "Shift e drift" antigênicos
- Interações entre dois vírus
 - Complementação
 - Recombinação
 - Reativação genética
 - Mistura de fenótipos
- Aplicações de vírus: terapia genética e vacinas recombinantes
 - Terapia genética
 - Vacinas recombinantes
- Glossário

Replicação viral

A replicação dos vírus é um processo muito complexo e diverso. Os mecanismos de replicação dependem fundamentalmente do tipo de ácido nucléico e da organização do genoma de cada vírus. Apesar da diversidade de estratégias de replicação, existem vários aspectos em comum nas diversas etapas de replicação. O ciclo replicativo de todos os vírus contém as seguintes etapas: ligação/adsorção, penetração, desnudamento (se necessário), síntese protéica (expressão gênica), replicação do genoma, montagem e egresso ou liberação.

- A adsorção (ou ligação) depende da interação física entre os vírions e a superfície da célula-alvo. A adsorção é essencialmente uma interação ligante-receptor. Como consequência, a especificidade de células-alvo e de hospedeiros susceptíveis é determinada. Sem adsorção/ligação a infecção não pode ocorrer. Por outro lado, nem todos os eventos de adsorção resultam em infecção produtiva. Em outras palavras, a adsorção é necessária, mas não assegura que a replicação irá ocorrer.
- Penetração refere-se à introdução do ácido nucléico viral na célula, internalização do nucleocapsídeo via endocitose mediada por receptor, ou fusão do envelope viral com a membrana plasmática. Como resultado, o genoma viral é liberado e se localiza no citosol ou em vesículas endocíticas.
- O desnudamento do genoma das proteínas componentes do nucleocapsídeo pode necessitar a participação de proteínas celulares ou outros fatores. O desnudamento é um pré-requisito para a expressão do genoma. Após o desnudamento, o genoma prossegue no ciclo replicativo ou uma cópia dele é integrada no cromossoma do hospedeiro e permanece latente até ser ativado (retrovírus).
- Síntese protéica (ou expressão gênica) – O RNA mensageiro (RNAm) é produzido e traduzido em proteínas. Independentemente do tipo (DNA ou RNA; cadeia simples ou dupla; segmentado ou não-segmentado), o genoma deve ser capaz de originar RNAs mensageiros que sejam reconhecidos e traduzidos pela maquinaria celular de tradução.

- Como será descrito para cada grupo de vírus, existe um mecanismo único pelo qual a maquinaria celular torna-se amplamente dedicada à síntese de produtos virais em detrimento da síntese de proteínas celulares.
- Replicação do genoma: o mecanismo de replicação depende do tipo de ácido nucléico, estrutura e topologia do genoma. Nos vírus mais simples, a replicação do genoma é uma tarefa executada por enzimas celulares; outros vírus mais complexos codificam as suas próprias enzimas replicativas.
- Maturação é a montagem completa das partículas víricas. A montagem dos vírus não-envelopados consiste primariamente da associação do genoma com as proteínas que formam o nucleocapsídeo. Esse processo ocorre espontaneamente através de interações entre proteínas e entre estas e o genoma. Na maturação dos vírus envelopados, o nucleocapsídeo adquire um envoltório externo (envelope) que consiste de membranas celulares (nuclear, Golgi, retículo endoplasmático ou membrana plasmática) contendo uma camada dupla de lípidios derivadas da célula e proteínas virais inseridas. O envelope é adquirido por um processo denominado de "brotamento".
- Egresso (liberação) dos vírions. Na replicação dos vírus sem envelope, milhares de vírions recém-formados são liberados pela morte e lise celular. Nos vírus envelopados, a progênie viral é liberada através de brotamento, sem necessariamente implicar em morte celular. No entanto, muitos vírus envelopados também podem ser liberados pela morte e desintegração da célula.

Replicação dos vírus DNA

- Em geral, os vírus DNA replicam no núcleo. Exceções são os poxvírus e os iridovírus (vírus de insetos e peixes) que utilizam "fábricas" citoplasmáticas.
- Os vírus DNA que replicam no núcleo utilizam a RNA polimerase-dependente de DNA celular para a transcrição. A maioria dos poxvírus e iridovírus trazem transcriptases nos vírions, o que lhes permite replicar no citoplasma.
- A replicação dos vírus DNA é semiconservativa e simétrica, com ambas as cadeias sendo replicadas. Em vírus DNA de cadeia dupla, como os adenovírus, a replicação das duas cadeias não segue necessariamente o mesmo mecanismo.
- As enzimas DNA polimerases da célula eucariota podem replicar genomas pequenos ou médios (papilomavírus, poliomavírus), enquanto os genomas grandes geralmente codificam as suas próprias polimerases (adenovírus, herpesvírus, poxvírus).
- A maturação dos vírus DNA (exceção dos poxvírus e iridovírus) ocorre no núcleo.
- As proteínas estruturais são transportadas do citoplasma para o núcleo, onde interagem entre si e com o genoma e são integradas na estrutura do capsídeo que envolve o ácido nucléico.
- Os vírus envelopados completam a maturação através do brotamento na membrana nuclear (iridovírus) ou da membrana plasmática.

Replicação dos vírus DNA de cadeia dupla

Esses incluem as seguintes famílias de vírus animais: Asfaviridae, Poxviridae, Iridoviridae, Herpesviridae, Polyomaviridae, Papillomaviridae e Adenoviridae (Fig. 3.1).

- Os genomas variam entre 5 - 8 kb (Polyomaviridae) e mais de 300 kb (Poxviridae e Iridoviridae).
- Em geral, a replicação do genoma ocorre no núcleo, por enzimas do hospedeiro (para pequenos vírus como os poliomavírus e papilomavírus) ou por replicases codificadas pelo vírus (adenovírus, herpesvírus). A replicação dos poxvírus e alguns iridovírus ocorre no citoplasma, resultando na formação de corpúsculos de inclusão que contêm as enzimas virais necessárias para a replicação, como as polimerases de DNA dependentes de DNA.
- O DNA de cadeia dupla pode apresentar-se circular, linear, ou linear com as extremidades ligadas.
- Os genomas circulares pequenos são replicados em direção bidirecional, semelhante ao que ocorre com os plasmídios. Acredita-se que a replicação do DNA dos poliomavírus (cadeia dupla circular) seja mediada por um mecanismo giratório que contêm a endonuclease e ligase. A endonuclease clivaria uma das cadeias, permitindo a replicação de um pequeno segmento. Esse "corte" seria então reparado (ligado) pela ligase.

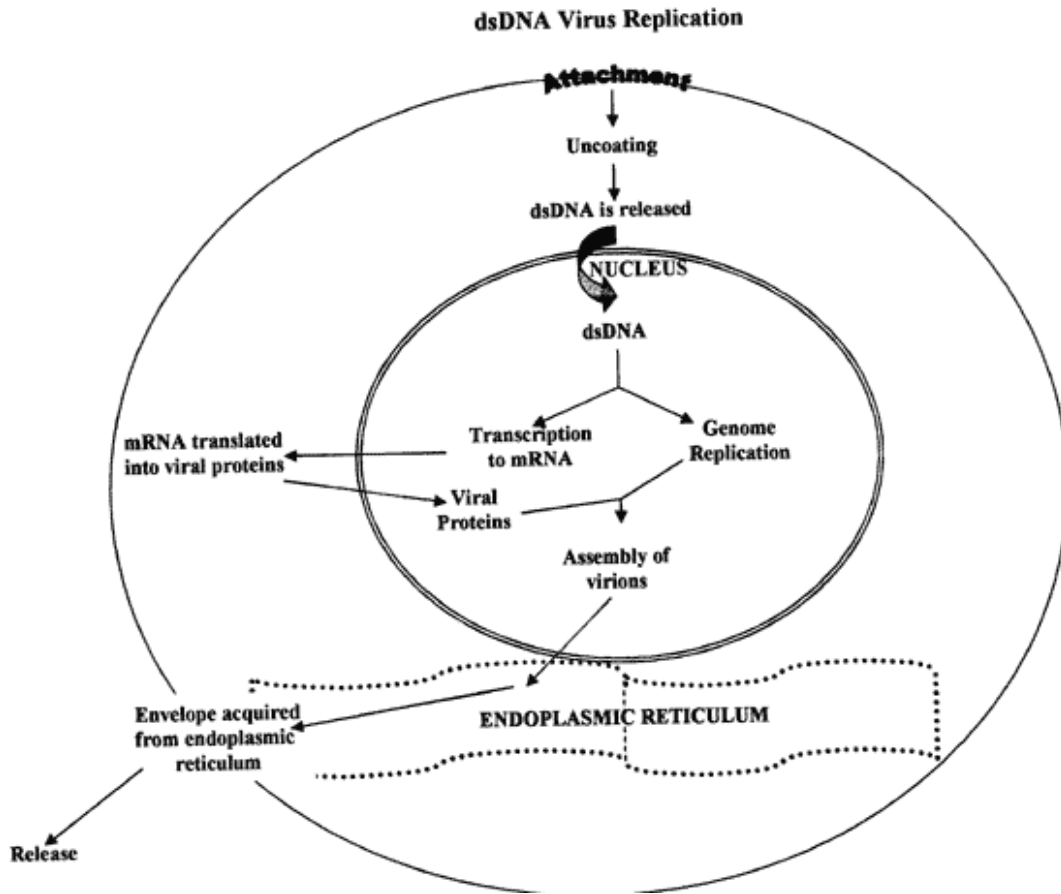


Figura 3-1. Esquema geral de replicação dos vírus DNA de cadeia dupla.

Replicação dos vírus DNA de cadeia simples

Inclui as famílias Circoviridae e Parvoviridae de vírus animais

- Os genomas variam de 3 a 6 kb.
- O DNA circular dos circovírus parece ser replicado por um mecanismo de "rolling circle".
- A replicação ocorre no núcleo e envolve a síntese de uma cadeia de DNA sentido negativo (DNA -) para servir de molde para a síntese da cópia genômica (DNA +) dos vírions. Esse processo envolve a produção transiente de um DNA de cadeia dupla, denominado de forma replicativa.
- A penetração do DNA de cadeia simples no núcleo estimula o seu "reparo" por enzimas celulares, originando a forma replicativa (cadeia dupla). No caso dos genomas circulares, a forma replicativa associa-se com histonas celulares e outras proteínas nucleares e passa a ser comportar como um cromossoma do hospedeiro. Formas lineares possuem mecanismos derivados que permitem o genoma ser replicado sem perda de DNA a cada ciclo de replicação.
- Os genomas DNA de cadeia simples podem ser lineares de um único componente (Parvoviridae) ou circulares de um único componente (Circoviridae).
- (Fig. 3.2).

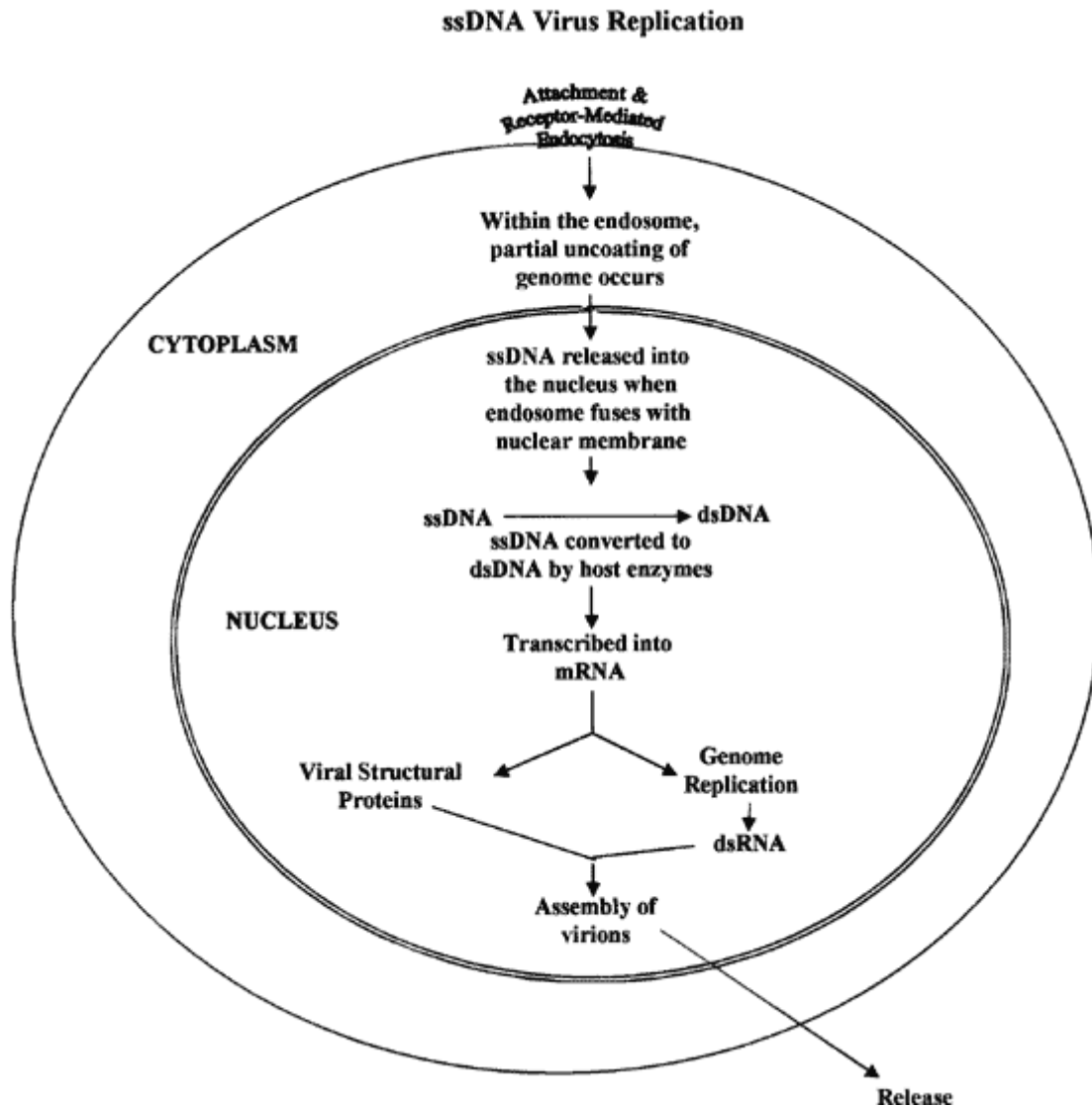


Figura 3-2. Esquema geral de replicação dos vírus DNA de cadeia simples.

Vírus DNA de cadeia dupla com transcrição reversa

- Inclui a família Hepadnaviridae
- O genoma é constituído de uma molécula circular (não-covalente) de DNA parcialmente cadeia dupla, com 3.2kb.
- Após a penetração e desnudamento parcial, o DNA genômico penetra no núcleo e a cadeia incompleta é completada pela DNA polimerase viral e/ou enzimas celulares. Uma vez completada, uma enzima ligase realiza a ligação das extremidades.
- No núcleo, o genoma comporta-se como um minicromossoma, conjugando-se com histonas celulares. No entanto, as DNA polimerases celulares não replicam o genoma viral.
- O genoma é então transcrito em sua integridade, originando um RNAm com a extensão total do genoma, denominado de pgRNA (RNA pré-genômico), que é maior do que o molde DNA do qual foi transcrito, devido à adição de uma cauda poli-A produzida. Esse intermediário RNA que serve de molde para o DNA do vírion. RNAs mensageiros menores são também produzidos, dando origem à polimerase viral e proteínas do capsídeo. A montagem parcial dos capsídeos prossegue.
- Algumas cópias do pgRNA são encapsidadas nos vírions recém-formados, onde servem de molde para a polimerase viral sintetizar o cDNA (transcrição reversa). Após a síntese da primeira cadeia de

DNA complementar (cDNA), a polimerase degrada o pgRNA que serviu de molde e sintetiza a cadeia complementar de DNA. Os vírions que são liberados das células por brotamento contêm um genoma DNA de cadeia dupla.

Replicação dos vírus RNA

- A replicação da maioria dos vírus RNA ocorre estritamente no citoplasma das células e é independente da maquinaria nuclear. Exceções são os ortomixovírus que requerem fatores da transcrição celular e os retrovírus que replicam via um intermediário DNA.
- A ligação (adsorção) ocorre por interações eletrostáticas entre os vírions e os receptores celulares específicos.
- Os vírus penetram na célula através de endocitose mediada por receptor ou através de fusão na membrana celular ou na vesícula endocítica (vírus envelopados).
- O desnudamento ocorre no citoplasma, ou durante a passagem (translocação) através da membrana celular, como parece ser o caso dos picornavírus. O RNA dos reovírus, no entanto, nunca é completamente desnudo, permanecendo em partículas parcialmente desmontadas durante a transcrição e replicação.
- O genoma de alguns vírus RNA é constituído de uma única molécula de RNA (não-segmentados); em outros constituem-se de mais de um segmento (segmentado).
- O RNA de alguns vírus animais possui função de RNA mensageiro (sentido +) e pode ser diretamente traduzido, enquanto o genoma de outros é sentido negativo (anti-sense) e deve ser inicialmente transcrito em RNAs de sentido + por polimerases de RNA dependentes de RNA virais (transcriptases).
- Os retrovírus possuem uma enzima transcriptase reversa (polimerase de DNA dependente de RNA), o que permite a formação de uma molécula de DNA cadeia dupla intermediária (provírus DNA), que é incorporada no genoma da célula hospedeira e é subsequentemente transcrita em RNAs mensageiros por polimerases de RNA dependentes de DNA do hospedeiro.
- Em geral, a replicação do RNA é semi-conservativa e segue-se pela formação de um intermediário replicativo (R1). O R1 consiste do RNA parental que serve de molde para a transcrição de várias cadeias de RNA, que eventualmente se destacam do molde e servem de molde para a síntese de RNA viral.
- A replicação do RNA de cadeia dupla dos reovírus é conservativa e assimétrica; apenas uma cadeia é replicada, ao contrário do DNA de cadeia dupla. O processo de replicação exige polimerases de RNA dependentes de RNA (replicases) que são codificadas pelo vírus.
- A maturação ocorre no citoplasma da célula, com o RNA viral se associando com as proteínas do capsídeo e formando o nucleocapsídeo. Os vírus envelopados completam a maturação pelo brotamento na membrana do retículo endoplasmático, aparelho de Golgi ou membrana plasmática.

Vírus RNA de cadeia dupla

- Inclui as seguintes famílias de vírus: Reoviridae e Birnaviridae.
- Os genomas desses vírus varia entre 4 a 20 - 27 kb em extensão.
- A adsorção ocorre via endocitose mediada por receptor. O vírion é parcialmente desnudo e o núcleo da partícula permanece na vesícula endocítica.
- A replicação é através de mecanismo conservativo; o RNA de cadeia dupla serve de molde para a produção de RNA mensageiro por uma enzima polimerase de RNA dependente de RNA. Grande parte do restante da replicação ainda é pouco conhecida.
- A replicação não envolve a formação de intermediários R1. Não ocorre a formação de RNA de cadeia dupla no citoplasma da célula infectada hospedeira.
- Todos possuem genomas lineares, segmentados. Cada segmento corresponde a um RNA mensageiro monocistrônico.
- Todos os genomas são lineares, mas podem ter dois segmentos (Birnaviridae) ou vários segmentos (os reovírus possuem 10 a 12).
- (Fig. 3.3).

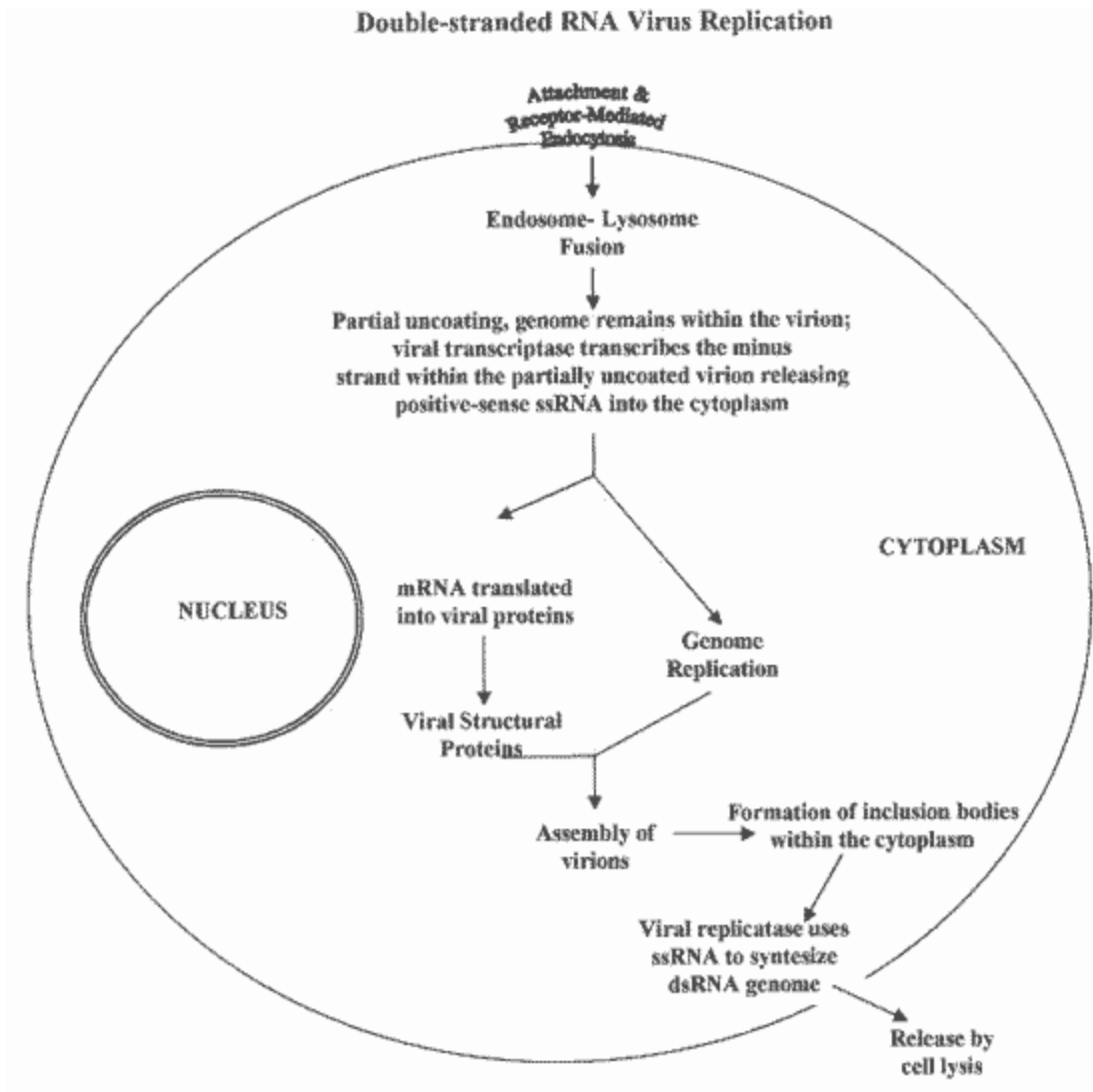


Figura 3-3. Esquema geral de replicação dos vírus RNA de cadeia dupla.

Vírus RNA de cadeia simples, polaridade positiva

- Incluem as seguintes famílias de vírus animais: Caliciviridae, Picornaviridae, Astroviridae, Nodaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Togaviridae e Arteriviridae.
- O tamanho do genoma varia entre menos de 5 até mais de 20 - 30 kb
- A penetração é via endocitose mediada por receptor. Então, o vírion é desnudo e o RNA cadeia simples é liberado no citoplasma.
- Os genomas possuem sentido de mensageiro e são totalmente ou parcialmente traduzidos em proteínas na primeira etapa da replicação viral.
- Os picornavírus e flavivírus possuem um genoma RNA de polaridade positiva como genoma, que se comporta como um mensageiro policistrônico. O genoma é diretamente traduzido em uma poliproteína extensa, que é processada co- e pós-tradução em várias proteínas virais por proteases do hospedeiro e virais.
- Os coronavírus apresentam um padrão complexo de transcrição, envolvendo várias etapas de tradução para completar o ciclo replicativo.
- Possíveis formas de genomas lineares são: único-segmento com várias ORFs (togavírus e calicivírus); único segmento com uma única ORF (picornavírus); dois segmentos com única ORF (nodavírus).
- (Fig. 3.4).

Positive-Sense ssRNA Virus Replication

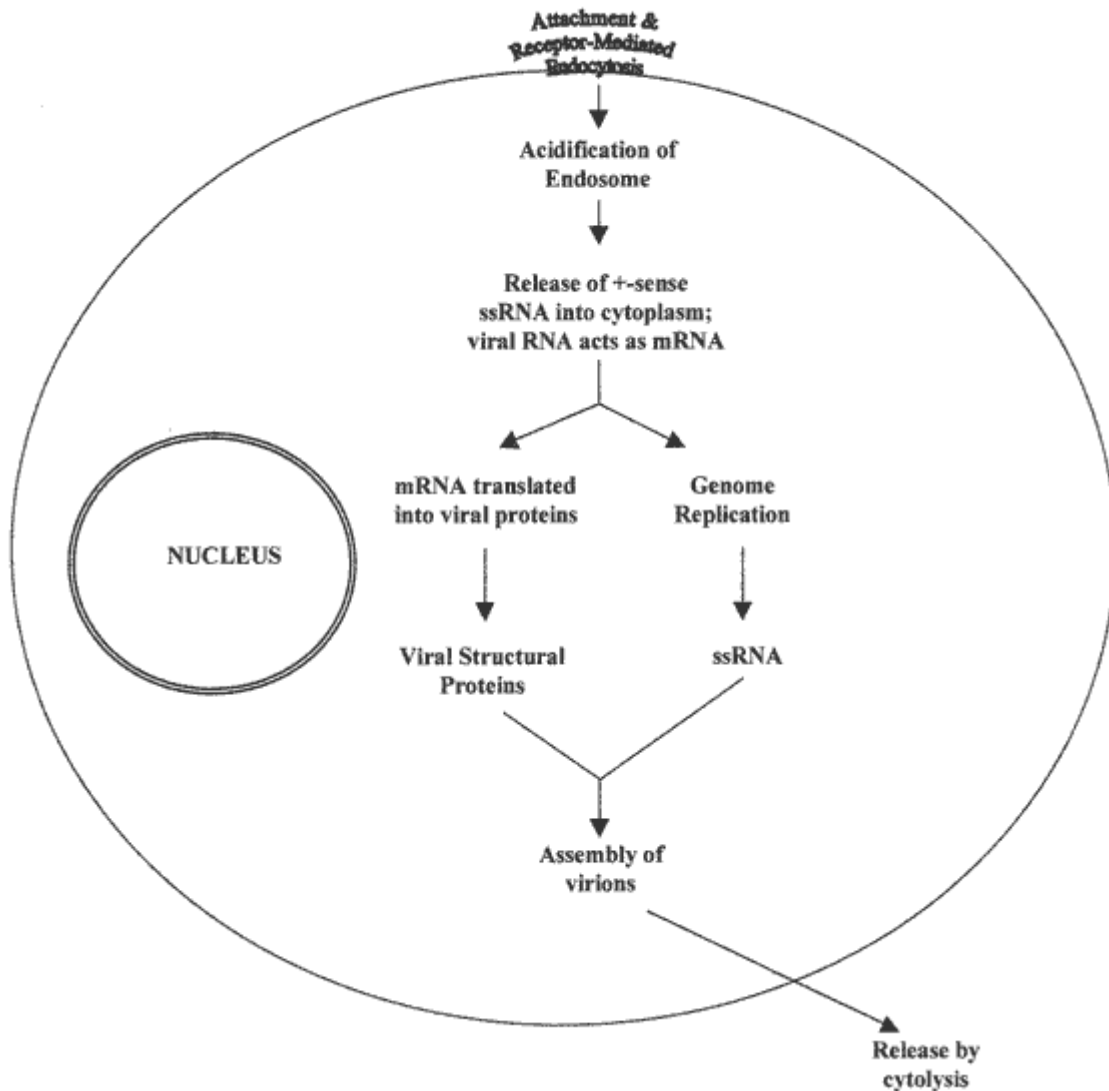


Figura 3-4. Esquema de replicação dos vírus RNA de cadeia positiva.

Vírus RNA de cadeia simples, sentido negativo

- Inclui as seguintes famílias de vírus animais: Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Bornaviridae, Filoviridae, Deltavírus, Arenaviridae, Bunyaviridae.
- Os genomas variam entre 10 a 14 kb e 11 a 20 kb de extensão. Como os genomas são de sentido negativo, não são traduzidos diretamente. Por isso, esses vírus devem trazer a suas polimerases/replicases nos vírions para realizar a transcrição/replicação do genoma.
- Os ortomixovírus possuem genomas segmentados. O primeiro passo na replicação é a transcrição dos RNA de sentido negativo pela polimerase de RNA dependente de RNA viral.
- Os rhabdovírus possuem genomas não-segmentados. A replicação também requer a transcrição pela polimerase de RNA dependente de RNA viral.
- No caso dos vírus ambissense, a transcriptase é codificada pela região de; polaridade positiva que eventualmente mediará a transcrição das regiões de polaridade negativa.

- Possíveis arranjos genômicos incluem: segmento único com ORFs múltiplas (filovírus, paramixovírus, rabdovírus), dois segmentos ambissense (arenavírus), três segmentos polaridade negativa ou ambissense (buniavírus) e seis a oito segmentos (ortomixovírus).

Negative-Sense ssRNA Virus Replication

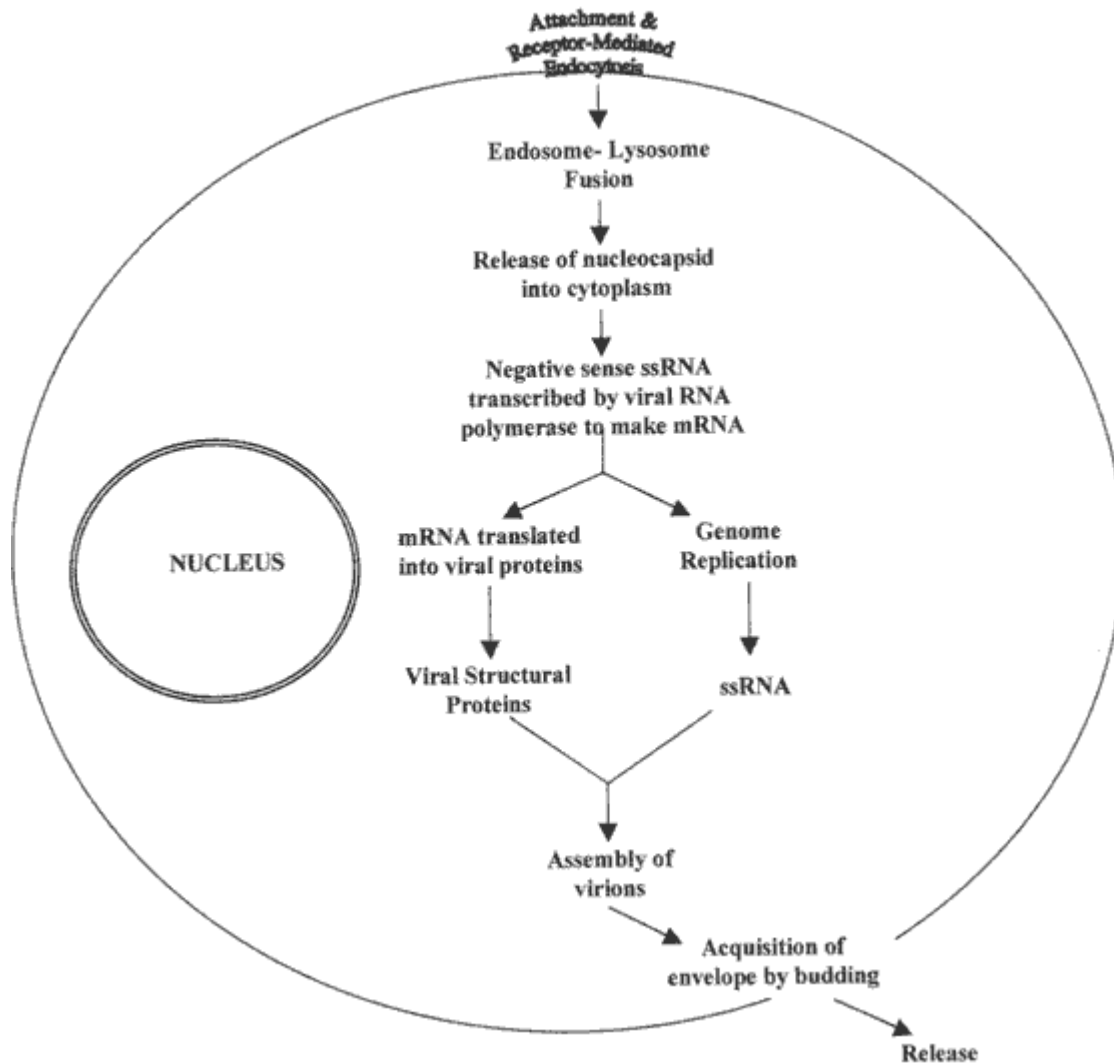


Figura 3-5. Esquema de replicação dos vírus RNA de cadeia negativa.

Vírus RNA de cadeia simples, polaridade positiva, com transcrição reversa

- Inclui os vírus de vertebrados da família Retroviridae
- Este genoma viral é formado por cópias diplóides de uma molécula de RNA de cadeia simples mantidas juntas por proteínas. Possui cap na extremidade 5' e possui poli-A na extremidade 3' e possui quatro regiões codificantes características (gag-pro-pol-env). Essas regiões são: gag (antígenos grupo-específico: genes da proteínas da matriz, nucleoproteína, capsídeo); pro (gene da protease); pol (genes da transcriptase reversa e RNase H); env (genes do envelope, que ligam nos receptores).
- A conversão do RNA em DNA de cadeia simples é mediada pela enzima viral transcriptase reversa. O DNA cadeia dupla resultante chamado de provírus, é finalmente integrado aos cromossomas do hospedeiro pela enzima viral integrase.

- Uma vez integrado no genoma do hospedeiro, o DNA viral (ou provírus) permanece latente até ser ativado em produção ativa de vírions. O provírus é então transcrito em RNAs mensageiros pela RNAs polimerase II celular.

Genética viral

A seleção natural atuando nos genomas virais durante ao longo dos anos tem resultado em grande diversidade genética para alguns vírus. Os genomas virais são as chaves para se entender como os vírus interagem com as células que eles infectam. O rápido conhecimento crescente da genética viral tem levado a muitas aplicações e técnicas muito úteis. Algumas importantes áreas de interesse são discutidas a seguir.

Mutação

Mutação é uma alteração na seqüência do genoma de um organismo. O organismo possui a mutação é denominado de mutante. A alteração baseia-se na comparação com o vírus de campo (vírus de referência). Dessa informação, cepas (vírus de campo de um mesmo vírus), tipos (sorológicos ou biológicos) e variantes (fenotipicamente diferentes do vírus de campo por razões genéticas desconhecidas) podem ser identificados. Mutações são eventos neutros que podem ser atuados por seleção natural. Se a mutação aumenta a sobrevivência (transmissão e replicação) do organismo, ela possui uma vantagem seletiva. Se a mutação é prejudicial a multiplicação e sobrevivência, o organismo será eventualmente eliminado da população. Se a mutação não altera a sobrevivência do organismo sobreviver ou o seu fenótipo, então a mutação pode passar despercebida. Mutações podem ocorrer por dois mecanismos diferentes, mutações espontâneas ou mutações induzida.

- Mutações espontâneas são endógenas, sendo resultado de erros das polimerases de DNA e RNA ao incorporar formas tautoméricas naturais dos nucleotídeos. Os vírus DNA são tipicamente mais geneticamente estáveis do que os vírus RNA; a taxa de mutação é de 10^{-8} a 10^{-11} por nucleotídeo incorporado. Isso se deve, em parte, que as polimerases de DNA frequentemente possuem alguma habilidade de correção de erros. Os vírus RNA são consideravelmente menos geneticamente estáveis, com taxas de mutação espontânea entre 10^{-3} a 10^{-4} por nucleotídeo incorporado. As polimerases de RNA tipicamente não possuem capacidade de correção de erros. Apesar disso, alguns vírus RNA são relativamente estáveis geneticamente (poliovírus). Acredita-se que esses vírus possuem taxas de mutação tão altas como os outros vírus RNA, mas são tão precisamente adaptados para a replicação e transmissão que pequenos erros resultam em sua eliminação.
- Mutações induzidas são exógenas, o resultado da exposição a agentes mutagênicos (químicos ou radiação) que aumentam significativamente a taxa de mutação daquele organismo. Os mutagênicos químicos agem ou diretamente nas bases ou indiretamente provocando mal-pareamento de bases. A radiação ultravioleta pode provoca a formação de dímeros de pirimidina, radiação ionizante pode danificar o DNA diretamente pela quebra de ligações químicas ou indiretamente por formar radicais livres que, por sua vez, danificam o DNA.

Existe uma variedade de fenótipos que são produzidos como resultado de mutações. Alguns dos mais comuns são:

Mutação de espectro de hospedeiro

Mutações que permitem a alteração de hospedeiros de um determinado vírus do original associado com o vírus de campo. Esse tipo de alteração acredita-se tenha ocorrido com o parvovírus felino, que estendeu seu espectro de hospedeiros e tornou-se capaz de infectar cães.

Mutações letais condicionais

Inclui uma série de mutações que replicam sob algumas condições, afora estas o vírus de campo é capaz de replicação, mas o condicional não. Exemplos de mutantes condicionais letais são os mutantes temperatura-sensíveis (TS) e mutantes adaptados ao frio. Mutantes temperatura sensíveis têm sido utilizados na produção de vacinas e mutantes adaptados ao frio têm sido usados para análise dos ciclos replicativos virais.

Mutantes de tamanho/morfologia de placa

Como resultado de mutações, esses vírus podem produzir placas que diferem daquelas do vírus de campo. Essa informação algumas vezes se correlaciona com a infectividade de uma determinada cepa de vírus.

Mutações nonsense (âmbar)

Refere-se a mutações em ponto que resultam na formação de um códon stop de tradução na posição em que um aminoácido é incorporado na proteína do vírus de campo. Como resultado, a proteína é truncada e geralmente afuncional. A mutação mais comum é para o códon UAG, chamado de âmbar.

Mutações de deleção

São resultado da perda de nucleotídeos em algum local do genoma, variando de apenas uma simples base até seções inteiras do genoma. Essas podem ocorrer naturalmente ou ser produzidas em laboratório, e são usadas no desenvolvimento de vacinas virais ou para atenuar um vírus para vacinas.

Shift e drift antigênicos

Shift antigênico (sem termo equivalente em português) refere-se à troca de um antígeno associado com um patógeno viral devido a aquisição de um gene novo inteiro ou alteração de um gene pré-existente. Tipicamente, shift antigênico é observado naqueles vírus que possuem genomas segmentados, como os ortomixovírus, bunivírus e arenavírus. A coinfeção de uma célula com dois isolados numa mesma célula pode resultar no empacotamento de genomas misturados, contendo alguns segmentos de um vírus e outros do outro vírus.

Drift antigênico refere-se é o resultado da acumulação de mutações em ponto (substituições simples de bases) e tem sido identificada como o mecanismo associado com a variação antigênica observada nos vírus da influenza e pode ser o mecanismo responsável pela variabilidade observada nos rinovírus.

Interações entre dois vírus

Infecções com dois ou mais vírus diferentes sabidamente podem ocorrer na natureza como também em cultivo. Essas são chamadas infecções mistas podem resultar em novas combinações virais e originar novas variantes dos vírus. A seguir são descritas algumas das interações que podem ocorrer em infecções mistas:

Complementação

A complementação pode ocorrer durante uma infecção mista em que um dos vírus é deficiente em um dos seus produtos gênicos. Sem essa proteína, o vírus seria incapaz de ser transmitido e replicar e seria, portanto uma partícula defectiva. Numa infecção mista, se o segundo vírus envolvido sintetiza o produto (complementa o defeito), a partícula defectiva é capaz de completar o processo de transmissão e replicação. Na natureza, complementação ocorre com o vírus humano da hepatite D. O vírus é deficiente em um antígeno de superfície que é provido pelo vírus da hepatite B em infecções mistas.

Recombinação

Recombinação genética é a troca de um segmento de material genético entre dois cromossomas virais em locais onde existe grande homologia. Como resultado, a progênie é diferente dos dois vírus parentais. A recombinação é freqüente em vírus DNA e nos vírus RNA que possuem uma fase de DNA (retrovírus). Atualmente, três mecanismos de recombinação já foram identificados:

Recombinação intramolecular

Recombinação que é mediada por enzimas celulares entre duas regiões de uma única molécula de DNA de cadeia simples, resultando numa alça da região intermediária, liberando uma molécula de DNA cadeia dupla menor e uma molécula separada de DNA de cadeia dupla. O reverso dessa reação também pode ocorrer, resultando na integração de uma molécula de DNA cadeia dupla em uma outra molécula de DNA cadeia dupla. Esse tipo de recombinação ocorre tipicamente em vírus DNA não-segmentados.

Recombinação por escolha-de-cópia

Recombinação genética em que a nova molécula de ácido nucléico surge pela replicação de determinadas partes de cada molécula parental e pela alternância entre as duas (maternal e parental). Esse mecanismo é pouco conhecido e ocorre em vírus RNA não-segmentados.

Ressortimento

Ocorre em infecções mistas com variantes virais que possuam genomas segmentados infectando a mesma célula. A progênie viral pode conter alguns segmentos de um parente e outros do outro parente. Esse é

um processo efetivo que ocorre em ortomixovírus, reovírus, arenavírus e bunivírus. Esse mecanismo não é bem entendido. O ressortimento tem sido implicado no aparecimento de cepas novas altamente virulentas do vírus da influenza durante o século 20.

Reativação genética

É um caso especial de recombinação/ressortimento que ocorre em infecções mistas quando um ou os dois vírus são não-infecciosos. A progênie resultante de recombinação ou ressortimento pode ser agora infecciosa e contém marcadores dos dois parentais. Se apenas um dos parentais era defectivo, o processo é chamado de reativação cruzada ou resgate de marcador. Se os dois vírus eram defectivos, o processo é chamado de reativação múltipla.

Mistura fenotípica

Mistura fenotípica é um exemplo de interação não genética entre dois vírus. Como resultado de uma infecção mista, a progênie individual possui proteínas estruturais (envelope, capsídeo) de um ou de ambos os parentais. O genoma de um dos vírus parentais pode ser encapsidado em um dos três tipos de capsídeo (envelopes), originando seis tipos de progênie. Portanto, o fenótipo e o genótipo de muitos desses vírions progênie não se correspondem.

Aplicações da genética viral: terapia genética e vacinas recombinantes

Possivelmente as duas mais intrigantes aplicações do conhecimento adquirido sobre replicação e genética viral são a terapia genética e o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Essas técnicas são altamente promissoras para o desenvolvimento de novas estratégias para doenças genéticas e conferir proteção contra doenças humanas e animais.

Terapia genética

A terapia genética é baseada no uso de vírus sem propriedades patogênica, mas retendo a sua habilidade de seletivamente interagir com e transmitir seus genes (mais outros genes geneticamente manipulados) a células e tecidos específicos do hospedeiro.

Os retrovírus são excelentes meios para a entrega de genes para células-alvo do hospedeiro. A forma DNA dupla cadeia de seu genoma é estável e integra-se facilmente ao genoma do hospedeiro. Os vírus são manipulados geneticamente de modo que, uma vez o provírus seja integrado ao genoma, ele não seja capaz de replicar.

Freqüentemente isso significa o uso de vírus auxiliares para facilitar a entrada inicial do vírus manipulado nas células, através de complementação. Uma limitação desse método de terapia genética é a que em alguns casos o gene em questão necessita estar presente em todas as células do hospedeiro e não somente em um grupo seletivo de células e tecidos. Os retrovírus têm sido utilizados em terapia genética para a incorporação do gene da deaminase de adenina (ADA) nas células do sistema imune de pacientes com a síndrome de imunodeficiência ADA. Além dos retrovírus, alguns outros vírus atualmente sendo pesquisados para uso potencial como vetores em terapia genética são os adenovírus, vírus adeno-associados (parvovírus) e herpesvírus.

Vacinas recombinantes

Os três tipos de vacinas preparadas com técnicas de manipulação genética são discutidos no capítulo 6. Algumas dessas vacinas já estão em uso para prevenir doenças víricas humanas e animais.

Glossário

Ambissense: Refere-se a um genomas RNA que contém seqüências informativas que são ambos sentido positivo (pode ser usado diretamente como mensageiro) e sentido negativo (deve ser transcrito para produzir RNA mensageiro).

Replicação conservativa: Replicação de DNA e RNA de cadeias duplas de maneira que as cadeias originais não se tornam parte de cadeia recém-formada.

Vesícula endocítica: Vesícula formada no processo de endocitose, o engolfamento do vírus, que pode ser mediada por receptores de superfície ou por interações da membrana celular.

Membrana do Golgi: Membranas associadas com o aparelho de Golgi nas células eucariotas. O aparelho de Golgi recebe lipídios e proteínas recém-sintetizados do retículo endoplasmático, e modifica - os quimicamente e os envia aos locais apropriados da célula.

Corpúsculos de inclusão: Esses representam "fábricas" de vírus nas quais os ácidos nucléicos ou proteínas virais estão sendo sintetizados.

Ligase: Enzima do hospedeiro que produz ligações covalentes nos ácidos nucléicos associadas com quebras na cadeia backbone de açúcar-fosfato.

Monócistrônico: Contém informação para um só gene ou produto gênico.

Não-segmentados: Genoma contendo apenas um segmento.

Genomas multi-componentes: Genomas que possuem mais de uma molécula de ácido nucléico como genoma.

Mutágenos: Agentes físicos ou químicos que aumentam a taxa de mutações no DNA de um organismo.

DNA de polaridade negativa: DNA cuja transcrição não origina moléculas de RNAs que podem ser diretamente traduzidos como RNAs mensageiros. É o molde para a criação de genomas RNA de sentido negativo.

Policistrônico: Que contém informação para vários genes ou produtos gênicos.

DNA de polaridade (sentido) positiva: DNA cuja transcrição origina os genomas RNA de polaridade positiva ou que podem ser usados diretamente como mensageiros.

Transcriptase reversa: Enzima viral que usa RNA como molde para produzir DNA.

Replicação semi-conservativa: Replicação de RNA ou DNA de cadeia dupla na qual as cadeias originais (uma original, outra recém-sintetizada) tomam parte das recém-produzidas progênie DNA ou RNA de cadeia dupla.

Não-segmentados: Genomas que possuem uma única molécula de ácido nucléico como genoma.

Tautômeros: Formas isoméricas de compostos orgânicos e quando dois deles existem em equilíbrio é referido como tautomerismo.

Transcriptase: Enzima viral capaz de usar uma molécula de RNA como molde para transcrição.

Vírus de campo: O vírus natural, esses vírus são usados como cepas de referência para comparação com mutantes e variantes de um vírus particular.

Direitos reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento núm. A3403.0205.PT

Defesas do hospedeiro contra vírus

In: **A Concise Review of Veterinary Virology**, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 3-Mar-2005; A3405.0305.PT

D.J. Wise¹, **G.R. Carter**² and **E. F. Flores**³

¹Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

²Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

³Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil.

Traduzido por: **E. F. Flores**, Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil. (20-Oct-2005).

Índice

Defesas do hospedeiro

Efeitos imunológicos das infecções virais

Glossário

Assim como os vírus, que pela sua capacidade de infectar células e iniciar a replicação mediada pelo hospedeiro são capazes de causar doenças, o hospedeiro e as suas células possuem alguns mecanismos para prevenir, minimizar ou conter infecções virais. Este capítulo discute essas defesas, desde as respostas inatas e barreiras protetoras até a resposta imunológica específica. O resultado da interação entre o hospedeiro e o vírus pode se refletir na característica da doença.

A tabela 5.1 lista os mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro e os aspectos do ciclo replicativo viral aos quais estes são dirigidos.

Tabela 5.1. Interações entre as defesas do hospedeiro e o vírus.		
Tipo de defesa	Defesa efetora	Alvo efetor
Resposta imune inespecífica	Febre	Replicação viral
	Inflamação	Replicação viral
	Interferons	Replicação viral
	Células NK*	Células infectadas com vírus
	Fagocitose	Partículas víricas
Resposta específica humoral	Anticorpos	Partículas víricas, células infectadas com vírus
	Sistema complemento	Partículas víricas, células infectadas com vírus
Resposta imunológica celular	Linfócitos citotóxicos	Células infectadas com vírus
	Macrófagos ativados	Células infectadas com vírus, partículas víricas
	ADCC**	Células infectadas com vírus
* NK= Células "assassinas por natureza" (natural killer). ** ADCC= Citotoxicidade celular dependente de anticorpos.		

Defesas do hospedeiro

Barreiras físicas e químicas

As barreiras físicas e químicas fazem parte da resposta inata ou natural, sendo inerentes a cada hospedeiro ao nascer. Essas barreiras previnem ou limitam a infecção. Qualquer comprometimento na integridade de uma dessas barreiras permite ao vírus ter acesso às células do hospedeiro. Por outro lado, devido ao seu ciclo replicativo, alguns vírus são capazes de ultrapassar essas barreiras facilmente.

- **Pele:** A pele é uma barreira eficiente contra muitas infecções, inclusive contra aquelas víricas. Isto é porque a pele é composta, em parte por células mortas, queratinizadas, que não suportam replicação viral. Para ultrapassar essa barreira, os vírus necessitam penetrar mais profundamente no epitélio através de cortes, queimaduras ou picadas de insetos.
- **Membranas mucosas:** Essas agem como barreiras físicas, prevenindo o acesso direto às células do hospedeiro. Alternativamente, o muco interfere com a ligação dos vírus às células fornecendo receptores virais no muco. Por exemplo, os paramixovírus ligam-se em receptores ácido-siálico associados com as células do hospedeiro. A presença de glicoproteínas com resíduos de ácido siálico no muco interfere com essa ligação.
- **Epitélio ciliado:** A ação combinada dos cílios com o muco nos epitélios facilita o movimento físico dos vírus apreendidos para fora do corpo, reduzindo a sua infectividade. Os seguintes fatores são associados com a penetração nessa barreira: volume do inóculo, tamanho da gotícula, corrente de ar, umidade e temperatura.
- **pH ácido:** O pH ácido do trato gastrointestinal (pH 2) rapidamente desnatura as proteínas associadas com muitos vírus. No entanto, os enterovírus conseguem suportar esse pH ou usam a exposição a ele para facilitar o desnudamento e assim serem infecciosos no trato digestivo.
- **Lágrimas:** Estas proporcionam lavagem contínua para minimizar a quantidade de partículas víricas disponíveis para infectar as células da conjuntiva.
- **Ausência de receptores:** Isso envolve o espectro de hospedeiros ou receptores específicos de tecidos. Se o receptor necessário para a ligação do vírus não está presente, então a infecção não pode ocorrer.

Respostas inespecíficas

As respostas inespecíficas ocorrem em qualquer infecção viral. Essas respostas servem principalmente para limitar a disseminação do vírus a partir do sítio de infecção, impedir a replicação viral e auxiliar a resposta imunológica específica num ataque direcionado contra o vírus.

- **Febre:** Inibe a replicação viral estimulando outros mecanismos imunológicos e reduzindo assim a replicação viral. Além disso, a temperatura alta também pode inativar diretamente as partículas víricas. A importância da febre isoladamente durante a infecção viral não é conhecida.
- **Inflamação:** Refere-se a resposta inespecífica local, caracterizada por hiperemia, edema, calor e dor. Neutrófilos e macrófagos são recrutados para a área afetada pelas citocinas. Esse recrutamento auxilia na limitação da infecção. A produção contínua de citocinas e o recrutamento de células continuam até que o antígeno é efetivamente neutralizado. O reparo tecidual então começa a ocorrer. Em algumas situações, a resposta inflamatória se torna crônica, levando à imunopatologia induzida pelo vírus.
- **Interferons (IFN):** É um grupo de glicoproteínas hospedeiro-específicas, que inibem a replicação viral através da degradação de RNAs mensageiros virais e inibição da tradução de proteínas virais. Adicionalmente, os IFNs conferem resistência anti-viral às células vizinhas. Existem três tipos principais de IFNs produzidos pelo organismo: alfa, beta e gamma. Os IFNs alfa e beta são chamados interferons tipo I e estão envolvidos na resposta inata ou inespecífica. O IFN gamma está envolvido na resposta imunológica específica e será abordado posteriormente. IFNs alfa e beta atuam especificamente inibindo a tradução de proteínas virais, tendo pouco efeito na tradução de proteínas celulares. Esse fenômeno é denominado inibição seletiva. RNAs mensageiros virais são reconhecidos por seqüências nucleotídicas específicas do vírus que não são encontradas nas células hospedeiras. Além disso, o IFN estimula a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade classe (MHC-I) e II (MHC-II) na superfície das células do hospedeiro. Isso facilita o reconhecimento das células infectadas e o desencadeamento de uma resposta imunológica específica as células infectadas pelo vírus.

- IFN alfa: Estável a pH 2; a sua produção é induzida por produtos da replicação viral (vírus RNA estimulam mais do que vírus DNA) e RNA de cadeia dupla. São também conhecidos como interferons de leucócitos.
- IFN beta: Estável a pH 2; produção induzida por produtos da replicação viral (vírus RNA estimulam mais do que vírus DNA) e RNA de cadeia dupla. São também conhecidos como IFNs de fibroblastos.
- Células NK (natural killer): São células brancas do sangue, da linhagem linfopoietica. São também chamadas de terceira população de linfócitos (T, B e NK), células nulas ou linfócitos grandes granulares. Alguns vírus, como parte de seu ciclo replicativo, reduzem a expressão de moléculas de MHC-I pela célula infectada. As células NK reconhecem as células que não expressam ou expressam menos MHC-I e as destroem por apoptose. Portanto, elas identificam e matam células infectadas por vírus. As células NK destroem células infectadas através de mecanismos semelhantes aos utilizados pelos linfócitos T citotóxicos, descritos a seguir. São também importantes no reconhecimento e destruição de células tumorais.
- Fagocitose: Ação dos macrófagos e neutrófilos ao internalizar e destruir partículas virais. Os macrófagos se tornam ativados (mais eficientes para capturar e destruir) em resposta ao IFN gamma e outras citocinas.
- Cascata do complemento: A maioria dos vírus não é capaz de ativar o complemento pela via alternativa. No entanto, como a via clássica utiliza a interação anticorpo-antígeno para desencadear a cascata, esse mecanismo pode facilmente lisar partículas víricas e células infectadas.

Resposta imunológica específica

A resposta imunológica específica é moldada e dirigida especificamente contra o respectivo patógeno. Leva vários dias a várias semanas para se desenvolver. Portanto, o organismo depende das respostas inespecíficas para limitar a infecção até que os mecanismos específicos tenham sido produzidos. A resposta imunológica específica pode ser humoral (produção de anticorpos) ou mediada por células. Em algumas situações, a infecção viral resulta em imunopatologia característica ou induz imunossupressão.

Resposta imunológica humoral

A resposta imune humoral envolve a produção de anticorpos específicos contra antígenos específicos virais pelos plasmócitos, que são derivados dos linfócitos B. A estimulação da produção de anticorpos é o mecanismo primário envolvido na recuperação de infecções virais, em particular das infecções víricas citolíticas acompanhadas de viremia e infecções virais de células epiteliais superficiais. Os anticorpos produzidos podem ou não possuir atividade neutralizante anti-viral, com base na sua interação com as partículas víricas e nos seus efeitos no ciclo replicativo.

Na maioria dos casos, a produção de anticorpos é resultante da infecção viral. Isto é imunidade ativa. Alternativamente, um hospedeiro pode receber anticorpos pré-formados de um indivíduo recuperado. Isto é um exemplo de imunidade passiva. Anticorpos pré-formados são administrados a indivíduos que possam ter sido expostos a um determinado vírus, como o vírus da raiva. Vacinas são discutidas no capítulo 6.

- Anticorpos neutralizantes: São anticorpos que interferem com a capacidade dos vírus penetrar e replicar nas células. Eles podem interferir com a ligação do vírus no receptor, penetração e/ou desnudamento. Além disso, são capazes de danificar o envelope do vírus com o auxílio do complemento (via clássica). Anticorpos neutralizantes são mais efetivos no momento da infecção ou durante a viremia.
- Anticorpos não-neutralizantes: Não possuem atividade neutralizante direta, mas auxiliam a controlar/combater a infecção por outros mecanismos, como aumentando a degradação dos vírions por exemplo. Adicionalmente, podem servir de opsoninas para aumentar a eficiência de fagocitose de partículas víricas. Anticorpos antivirais que se ligam à proteínas virais na superfície de células infectadas podem também desencadear a cascata do complemento e levar à lise celular mediada por complemento.

Resposta imunológica mediada por células

A imunidade mediada por células (IMC) envolve a ação dos linfócitos T citotóxicos, citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC), ação das células NK e macrófagos ativados. A IMC representa o mecanismo de defesa mais importante em infecções não-citolíticas nas quais as membranas das células infectadas são alteradas pelo vírus.

- **Linfócitos T citotóxicos:** São linfócitos T específicos que reconhecem antígenos virais associados com moléculas do MHC-I na superfície da maioria das células infectadas. Esses linfócitos T possuem um antígeno de superfície chamado de CD8. A interação das células infectadas com os linfócitos T citotóxicos resulta na liberação de perforinas pelo linfócito T, que produzem poros na membrana da célula infectada. Também liberadas pelos linfócitos T citotóxicos são as granzimas, um grupo de protease de serina. A ação conjunta das *granzimas e perforinas* resulta na destruição das células infectadas. Além disso, os linfócitos citotóxicos ativam a proteína FAS, que induz apoptose nas células infectadas com vírus.
- **Citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC):** Refere-se à uma resposta imune na qual células infectadas por vírus são recobertas por anticorpos e tornam-se alvos para ataque das células do sistema imune como células NK, macrófagos e neutrófilos.
- **Linfócitos T auxiliares:** Esses linfócitos T possuem o antígeno de superfície CD4. São capazes de reconhecer antígenos protéicos associados a moléculas do MHC-II, que são encontrados apenas em alguns tipos de células, como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas. Os linfócitos T auxiliares coordenam a resposta imune específica aos antígenos através da secreção de citocinas que estimulam a produção de anticorpos pelos linfócitos B ou estimulam produção de resposta imune mediada por células.

Efeitos imunológicos da infecção viral

São dos resultados das interações entre o sistema imunológico do hospedeiro e a replicação viral.

Imunopatologia induzida por vírus

Imunopatologia induzida por vírus é o dano tecidual resultante da resposta imunológica contra o vírus. Essa imunopatologia pode resultar de várias interações imunológicas, como complexos antígeno-anticorpo e lesões teciduais devidos aos linfócitos T citotóxicos, anticorpos ou complemento. O tipo e localização da imunopatologia depende da infecção viral em particular. Alguns exemplos de imunopatologia produzida por vírus são:

- **Uveíte anterior:** Complexos antígeno-anticorpo se depositam no olho, estimulando inflamação local que resulta em uveíte anterior. Além disso, complexos imunes que permanecem na circulação se depositam nos rins, resultando em imunopatologia e glomerulonefrite. Isto é frequentemente observado durante o estágio de convalescença da hepatite infecciosa canina.
- **Coriomeningite linfocítica:** Causada por um arnavírus de camundongos, que resulta em lesões no sistema nervoso central (SNC) resultado da destruição de células infectadas por vírus, pelos linfócitos T citotóxicos. A encefalite dos cães velhos (vírus da cinomose, um paramyxovirus) é similar em sua patogenia, pois a imunopatologia é resultado da resposta imunológica mediada por células contra a infecção viral persistente.
- **Vírus da hepatite B das marmotas e dos patos:** Grande parte da lesão hepática associada com essas infecções são atribuídas à contínua ação dos linfócitos T citotóxicos dCD8+ destruindo hepatócitos infectados, e não à ação direta do vírus em si.

Imunossupressão induzida por vírus

Alguns vírus, como resultado da replicação, deprimem a resposta imunológica do hospedeiro, e assim são capazes de estabelecer a infecção. Imunossupressão induzida por vírus pode ocorrer tanto em infecções líticas como em infecções não líticas. É frequentemente observada como consequência de infecções víricas que envolvem infecção de linfócitos, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da imunodeficiência felina (FIV).

Escape do sistema imune

Alguns vírus pelo seu mecanismo de replicação utilizado são capazes de escapar do sistema imune do hospedeiro. Existem vários mecanismos através dos quais isto pode ocorrer durante a infecção. Alguns exemplos incluem a infecção de sítios imunológicos de privilégio, variabilidade antigênica dos vírions, inibição do IFN-beta, redução da expressão de MHC-I, inibição do processamento de peptídeos e expressão de estruturas homólogas às do sistema imunológico. Sítios imunológicos de privilégio são aqueles tecidos do corpo que não estão em contato direto com a circulação e portanto ficam separados do sistema imunológico. Esses incluem o cérebro, testículos, próstata, a retina do olho e as bolsas da bochecha dos hamsters.

A produção de substâncias/estruturas homólogas às do sistema imune incluem:

- O citomegalovírus produz glicoproteínas que são análogas dos receptores de Fc da IgG.
- O vírus do fibroma Shope produz um análogo do receptor do fator de necrose tumoral (TNF).
- O vírus do Epstein-Barr produz um análogo da interleucina 10 (IL-10).

Os tópicos sobre variabilidade antigênica (Capítulo 3), redução da expressão do MHC-I (Capítulo 4) e inibição do interferon-beta (ver acima neste capítulo) já foram abordados.

A latência (herpesvírus, retrovírus) também é um mecanismo de escape imunológico.

Os adenovírus produzem pequenos segmentos de RNA que bloqueiam a ativação dos interferons.

Glossário

Via alternativa do complemento: Via de ativação do complemento no qual o componente C3 é clivado e o complexo C5-C9 é formado sem a necessidade do C1, C2 ou C4. Não requer anticorpos.

Complexo antígeno-anticorpo: É um complexo macromolecular formado pela interação específica entre anticorpo e antígeno. Também chamado de complexos imunes.

Via clássica do complemento: Série de reações enzimáticas-substrato de ativação sequencial desencadeada por complexos antígeno-anticorpo e envolvendo todos os componentes do complemento.

Citoquinas: Moléculas solúveis que mediam interações entre células.

Proteína FAS: Proteína transmembrana do tipo 1 da superfamília receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). É expressa em vários tipos de células incluindo aquelas da linhagem mielóide.

Interleukin (IL)-10: Citoquina que pode reduzir a resposta imune contra vírus pela inibição da produção de IFN-gamma.

Opsonina: Substâncias que liga-se a partículas, incluindo microorganismos, facilitando a sua fagocitose.

Fator de necrose tumoral: Citoquina produzida por monócitos/macrófagos (TNF-alfa) e alguns linfócitos T (TNF-beta). São diretamente tóxicos para células neoplásicas e são também envolvidas na inflamação.

Direitos reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento núm. A3405.0305.PT

Prevenção de doenças víricas, vacinas e drogas antivirais

In: **A Concise Review of Veterinary Virology**, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 17-Mar-2006; A3406.0306.PT.

D.J. Wise¹, G.R. Carter² and E. F. Flores³

1 Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

2 Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

3 Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil.

Traduzido por: **E. F. Flores**, Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil. (18-Nov.-2005).

Índice

Generalidades

Vacinas

Imunização passiva

Imunidade de rebanho

Drogas antivirais

Glossário

Generalidades

Prevenção de infecções

O único método seguro de evitar a infecção viral é evitar a exposição. Na prática, isso pode ser obtido permitindo a convivência apenas de animais sem evidência de exposições prévias. Esse contato restrito é referido como "rebanho fechado". Para manter efetivamente esse status fechado, todos os novos animais anexados ao rebanho e animais que vão a exposições-feiras devem ser isolados dos demais por pelo menos 2 a 3 semanas.

Durante esse período, estes animais são monitorados para sinais clínicos e testados sorologicamente para evidência da infecção. Prevenir a infecção através da restrição de contato é um método efetivo em áreas onde certos agentes, são relativamente raros, mas é impraticável em áreas onde esses vírus são endêmicos. Nesses casos, os esforços devem ser redirecionados para prevenir-se a doença, ao invés de evitar-se a infecção.

Controle de infecção e doença

O fundamental para o controle de infecções e enfermidades virais são boas práticas manejo. Fatores de estresse desempenham importantes papéis predispondo os animais à infecção e na disseminação da enfermidade. Particularmente importantes são os estresses associados a subnutrição, superpopulação e alojamento em condições sem ventilação.

As práticas de manejo devem incluir medidas preventivas para proteger os fetos e recém-nascidos. Alguns vírus que produzem infecções subclínicas ou leves em animais adultos podem causar abortos ou doença grave em neonatos (exemplo: parvovírus em suínos). Então, esforços devem ser feitos para restringir o contato de fêmeas prenhes e recém nascidos com outros animais. É também muito importante se assegurar que os recém-nascidos recebem colostro, que contém anticorpos que conferirão proteção durante as primeiras semanas de vida.

Outro aspecto de bom manejo é a necessidade de minimizar o contato entre diferentes espécies de animais, pois alguns vírus causam infecções inaparentes em algumas espécies e doença grave em outras. Um exemplo é o vírus da pseudo-raiva, que causa infecções subclínicas em suínos adultos, mas é freqüentemente fatal para leitões, ovinos, cães e gatos.

Limpeza e desinfecção rigorosas, uso de aventais limpos e pedilúvios, são essenciais para evitar a disseminação de vírus através de fômites (Tabela 6.1). Esses itens do manejo devem ser praticados sempre, mas especialmente durante surtos da doença. Quando um surto ocorre, todos os animais devem ser submetidos a quarentena (isolados e observados) e, se indicado, tratados sintomaticamente.

Por exemplo:

- Receber a necessária fluidoterapia de suporte, como reposição de líquidos, em casos de diarreia severa.
- Solução aquosa de hipoclorito de sódio é efetiva na desinfecção. Ver tabela 6.1 para outros desinfetantes.
- Tratamento com antibióticos pode ser recomendada para prevenir contaminações bacterianas secundárias.

Tabela 6.1. Alguns desinfetantes comerciais comuns com atividade antiviral*			
Desinfetante	Exemplos	Usos	Observações
Álcool	Etanol, isopropanol	Mãos, termômetros	Ação virucida moderada a 7 - 80%; etanol é preferível
Clorohexidina	Hibitane, Nolvasan	Vários usos, incluindo mesas de exame, gaiolas e superfícies	Tolerante à presença de compostos orgânicos, fluidos corporais; caro
Detergentes iodoforos	Betadine, Wescadine, Redene	Água de beber, alimentos e utensílios, estábulos, desinfecção localizada.	Ação baseada na liberação do iodo e ação detergente; menos afetada por altos níveis de proteína; caros
Dióxido de etileno		Para materiais sensíveis ao calor	Disponível como gás comprimido a 10% com 90% CO ₂ ; senão é tóxico e explosivo
Formaldeído	Formalina	Lavanderia e superfícies de cama; como vapor para outras superfícies	Pequeno poder de penetração; pode causar hipersensibilidade irritante
Glutaraldeído	Cidex	Esterilização a frio para instrumentos com lentes	Solução a 2% tamponada com bicarbonato de sódio; virucida (10 minutos, pH 7.5 - 8.5); caro
Derivados do fenol	Lysol, Dettol, Staphene, Sudol	Mãos, mesas de exame, gaiolas, outras superfícies	Solução aquosa a 2.5%; eficácia é dependente da concentração e temperatura; alto conteúdo de proteína reduz a eficácia
Compostos de amônia quaternária	Zephiran, Roccal, Savlon	O Zephiran (cloreto de benzalcônio) é utilizado para feridas	Ineficaz contra muitos vírus; alto conteúdo protéico reduz a eficácia
Hipoclorito de sódio	Chlorox, Chlorise	O mesmo dos detergentes iodoforos	Altamente eficaz, ação rápida; proteína alta reduz eficácia; irritante; barato
*Informações aplicáveis à maioria dos vírus, porém há exceções.			

Vacinas

Em algumas situações a ocorrência de doença pode ser prevenida através de vacinação. Embora a vacinação não necessariamente previna a infecção, a sensibilização prévia do sistema imunológico permite uma resposta rápida e eliminação do vírus, antes que a doença ocorra; ou fazendo com que a doença seja leve e de curta duração. De fato, a vacinação é o método mais efetivo e com melhor relação custo-benefício em saúde animal. Existem dois tipos principais de vacinas virais de uso veterinário: que são amplamente utilizada na prática veterinária as produzidas com o vírus morto (inativado); e aquelas produzidas com o vírus vivo modificado (atenuado).

Vacinas virais mortas: consistem do vírus, geralmente cultivado em cultivo celular ou em ovos embrionados e posteriormente inativado quimicamente, principalmente por formalina ou beta-propiolactona. Essas vacinas geralmente contêm adjuvantes para torná-las mais imunogênicas. Vacinas inativadas normalmente requerem mais de uma dose para induzir imunidade e revacinações periódicas para manter imunidade adequada. As vacinas inativadas geralmente induzem imunidade que é menos protetiva e de duração mais curta que aquela induzida pelas vacinas vivas modificadas. Vantagens das vacinas inativadas: não reverterem à virulência e são seguras para uso em fêmeas prenhes e em animais imunodeprimidos.

Vacinas vivas modificadas: Consistem de vírus tornados menos virulentos por algum método. Isso geralmente obtido através de múltiplas passagens em cultivos celulares, ovos embrionados ou animais de

laboratório. Os vírus também podem ser atenuados pela deleção de genes específicos responsáveis pela virulência. A manipulação genética de vírus foi utilizada para produzir uma vacina atenuada contra a pseudo-raiva. Vacinas atenuadas geralmente conferem longa imunidade, pois a vacinação mimetiza a infecção natural. Uma vacina adequadamente atenuada não deve causar doença nos animais vacinados; mas potencialmente pode causar doença em indivíduos imunocomprometidos ou em fetos. Algumas vacinas vivas modificadas podem ser administradas pelas vias oral, nasal ou genital (prepuccial, vaginal) onde irão induzir resposta humoral secretória local (IgA). A principal desvantagem das vacinas atenuadas é a possibilidade de causarem sinais clínicos suaves, infecções fetais letais e o risco do vírus atenuado reverter à virulência. O vírus vacinal atenuado pode ser transmitido a animais em contato.

Vários novos métodos têm sido explorados no esforço de produzir vacinas mais seguras e eficientes. Alguns desses métodos são descritos a seguir:

Vacinas de subunidade: É um tipo de vacina inativada que contém porções (proteínas, fragmentos) do vírus, necessários para induzir imunidade.

Peptídeos sintéticos: São produzidas através de síntese química de pequenos segmentos (peptídeos) de proteínas virais e utilizadas como vacinas de subunidade mais refinadas.

Vacinas recombinantes. Existem três tipos principais:

Proteínas recombinantes: O gene do antígeno viral de interesse é clonado e o cDNA é introduzido no genoma de bactérias ou leveduras através de um plasmídeo, que produzem a proteína em grandes quantidades. Esse antígeno é então utilizado como vacina.

Vetores virais: O gene (ou genes) de um vírus grande (geralmente um poxvírus, adenovírus, herpesvírus) é deletado e substituído por um gene (genes) que codificam o antígeno desejado; o último é introduzido no animal e expresso nas células infectadas. O vírus que carrega o gene do antígeno desejado é chamado de vetor.

Vacinas com deleções de genes: Um vírus virulento é tornado menos virulento pela deleção de genes ou pela substituição de regiões-chave nos genes com outro material genético. Várias vacinas recombinantes estão sendo usadas, incluindo a proteína do vírus da hepatite B expressa em levedura; proteína do vírus da raiva expressa no vírus vaccínia; proteínas F e HA vírus da cinomose inseridos no genoma do poxvírus do canário.

Vacinas anti-idiotípicas: Vacinas anti-idiotípicas são produzidas em duas etapas. Inicialmente, o antígeno é introduzido num organismo para induzir a resposta imunológica. Esses anticorpos são então utilizados para imunizar um segundo animal, contra o qual produz resposta imune. Alguns desses anticorpos possuem as características do antígeno original. Esses anticorpos são chamados de anti-idiotípicos. Até o presente, vacinas anti-idiotípicas têm sido apenas testadas experimentalmente.

Vacinas de DNA: Nesta estratégia, o gene viral (ou genes virais) do antígeno protéico é introduzido no indivíduo por um plasmídeo, estimulando uma resposta específica e protetora de anticorpos. Até o presente esse tipo de vacina tem sido utilizado experimentalmente. Em esforços para se obter uma vacina efetiva para prevenir uma pandemia potencial de influenza, a estratégia de vacina de DNA está sendo investigada. A sua eficácia em induzir uma resposta imunológica apropriada em humanos deve ainda ser estabelecida. No entanto, uma vacina de DNA já foi licenciada nos Estados Unidos para a prevenção da infecção pelo vírus do Nilo Ocidental em equinos.

Vacinas com marcadores antigênicos: Essas vacinas únicas são defectivas em uma proteína ou possuem uma proteína a mais do que não está presente no vírus original. Dessa forma, a proteína a menos ou a mais pode servir de marcador para o vírus vacinal. Isto permite para os testes diagnósticos a diferenciação sorológica entre animais vacinados e animais infectados. Os testes sorológicos diagnósticos detectam anticorpos contra o vírus de campo, mas não contra o vírus vacinal alterado. Os métodos utilizados para criar vacinas de marcadores são a deleção de genes (falta de um peptídeo) ou a produção de vacinas de subunidade (peptídeo novo). Vacinas diferenciais estão comercialmente disponíveis para o vírus da pseudo-raiva (gene deletado) e herpesvírus bovino tipo 1 (gene deletado) e outras estão atualmente sendo produzidas ou em testes para outras doenças.

Vacinação *in ovo*

Esse tipo de vacinação é utilizado para a prevenção da doença de Marek. Ovos embrionados são inoculados com o uso de um aparelho automático aos 18 dias de incubação. Esse procedimento, que é seguro e eficaz, também é utilizado para vacinar contra a bronquite infecciosa e bursite infecciosa. Em geral, vacinas eficazes são disponíveis para os vírus que possuem um ou poucos tipos antigênicos e que podem ser obtidos em grande quantidade para a produção de vacinas. Curiosamente, é devido à grande variabilidade antigênica do vírus que a composição da vacina contra a influenza humana necessita ser regularmente (anualmente) alterada, de acordo com as cepas circulantes.

Imunização passiva

Imunização passiva refere-se à transferência de anticorpos para um animal não imune. As imunoglobulinas presentes no soro imune contêm anticorpos neutralizantes que previnem a ligação do vírus às células susceptíveis. Imunidade passiva natural inclui o recebimento de anticorpos maternos via placenta (IgG), colostro (IgG), ou âmnio da gema do ovo (IgY). O recebimento de quantidades insuficientes de anticorpos maternos pode resultar em morbidade e mortalidade altas por várias doenças víricas de animais jovens. Na prática clínica, as imunoglobulinas são geralmente administradas antes da exposição ou durante o período de incubação para alterar o curso da infecção. Anti-soro (produzido em animais doadores) protege por um período curto de tempo e possui uso limitado na prevenção de doenças víricas. Anti-soro tem sido utilizado para prevenir a cinomose canina, panleucopenia felina e doença do Nilo Ocidental em eqüinos. Em algumas criações de eqüinos e bovinos, armazenagem de colostro e posterior administração a neonatos é utilizado para aumentar a sua imunidade.

Imunidade de rebanho

Esse fenômeno ocorre quando uma proporção suficientemente grande de uma população ("rebanho") foi imunizada e portanto é imune a um determinado vírus. Um indivíduo que eventualmente não esteja imune contra o agente fica protegido, pois o restante do rebanho é incapaz de transmitir o vírus. Para ser efetiva, a vacina em questão deve prevenir a doença causada pelo vírus e a sua transmissão. Um efeito semelhante podem ser visto em doenças naturais, se a maioria da população, recupera-se da doença e fica imune por longo tempo, alguns poucos animais que não tenham sido infectados ficam protegidos pela imunidade de rebanho desde que não haja reservatórios animais no rebanho.

Drogas antivirais

Drogas antivirais possuem uso muito restrito em veterinária. No entanto, é provável que algumas drogas que são efetivas contra vírus humanos possam ser também efetivas contra vírus homólogos de animais. Essas drogas podem ser classificadas em duas categorias principais, de acordo com o seu mecanismo de ação. Essas são as drogas análogas de nucleosídeos e outras não-análogas de nucleosídeos discutidas abaixo.

Em 2006, o CDC relatou que uma cepa do vírus da influenza humana tipo A desenvolveu resistência a duas drogas anti-virais comumente utilizadas, rimantadina e amantadina. A cepa H3N2, predominante na estação da gripe, anteriormente e rotineiramente tratada com essas drogas, havia desenvolvido resistência. Essa informação indica a necessidade do desenvolvimento de drogas antivirais adicionais e possivelmente a necessidade do uso de um coquetel de drogas para o tratamento da influenza.

Nucleosídeos inibidores

Tabela 6.2 – Propriedades de alguns nucleosídeos inibidores.

Tabela 6.2. Propriedades de alguns nucleosídeos inibidores		
Nucleosídeo inibidor	Tipo de análogo	Vírus-alvo
Aciclovir	Análogo da guanosina	Vírus do herpes simplex Vírus da varicella zoster
Ganciclovir	Análogo da guanosina	Citomegalovírus
Cidofovir	Análogo da citosina	Citomegalovírus Papilomavírus humano
Vidarabine	Adenina com arabinose	Os herpesvírus
Iododeoxiuridina	Timidina; iodo no lugar do grupo metil	Vírus do herpes simplex
Trifluorotimidina	Análogo da timidina; 3 átomos de flúor no local de 3 átomos de hidrogênio	Vírus do herpes simplex
Azidotimidina	Timidina; grupo azida no lugar da 3'OH da ribose	Vírus da imunodeficiência humana
Dideoxiinosina	Inosina sem o grupo 3'OH	Vírus da imunodeficiência humana
Dideoxicitidina	Citosina sem o grupo 3'OH	Vírus da imunodeficiência humana
Stavudina	Timidina	Vírus da imunodeficiência humana
Lamivudina	Citosina	Vírus da imunodeficiência humana Vírus da hepatite B
Abacavir	Análogo da guanosina	Vírus da imunodeficiência humana

Tabela 6.2. Propriedades de alguns nucleosídeos inibidores		
Nucleosídeo inibidor	Tipo de análogo	Vírus-alvo
Tenofovir	Análogo da adenosina monofosfato	Vírus da imunodeficiência humana
Ribavirina	Análogo do precursor da guanina	Vírus respiratório sincicial Vírus da influenza B

Várias drogas antivirais comerciais são análogos de bases/nucleosídeos, que interferem com a ação das polimerase de ácido nucléico virais. Os mais comuns são: acicloguanosina (aciclovir), dihidroxipropoximetilguanina (ganciclovir), adeninaarabinosida (vidarabine) e azidotimidina (zidovudine). Veja a Tabela 6.2 para uma lista de alguns nucleosídeos inibidores e os vírus contra os quais eles são utilizados. As drogas antivirais não possuem amplo uso em medicina veterinária. O aciclovir é eficaz contra herpesvírus e têm sido utilizado no tratamento de infecção ocular por herpesvírus em gatos. Essa droga também tem sido utilizada para tratar preventivamente pássaros psitacédeos caros que tenham sido expostos ao herpesvírus.

Inibidores não-nucleosídeos

Interferons e drogas antivirais têm sido utilizados para o tratamento de algumas infecções virais específicas. Os interferons foram discutidos no capítulo 5. Possuem função antiviral importante, pois aparecem cedo na infecção e desempenham um papel importante na recuperação. O mecanismo de ação é a inibição da síntese de proteínas virais. O tratamento de animais com IFNs exógenos não é praticado amplamente pela falta de IFNs espécie-específicos. Embora os IFNs não sejam necessariamente hospedeiro espécie-específicos, a sua ação depende de interações com receptores específicos nas superfície celular. O IFN-alfa humano, disponível no comércio como de DNA recombinante, possui alguma atividade cruzada com outras espécies e tem sido utilizado para tratar oralmente gatos infectados com o vírus da leucemia felina.

- Além dos IFNs, outras drogas que inibem a tradução de RNAm virais são a fomiversina e methisazona. A fomiversina (Vitravene) é uma molécula de DNA antisense que bloqueia a replicação do citomegalovírus. A methisazona (N-metil-beta-tiosemicarbazone) é específica para RNAm dos poxvírus.
- A amantadina (Symmetrel) e rimantadina (Flumadine) interferem com a penetração e/ou desnudamento de alguns vírus envelopados, mas é eficaz apenas contra o vírus da influenza A em humanos. Essas drogas não são comumente utilizadas nos EUA.
- Saquinavir (Invirase), indinavir (Crixivan), ritonavir (Norvir) e nelfinavir (Viracept) são inibidores de proteases virais. Elas atuam ligando-se no sítio ativo das proteases, impedindo a enzima de clivar outras proteínas. Essas drogas são frequentemente utilizadas como parte do coquetel de drogas no tratamento do HIV em humanos.
- Zanamivir (Relenza) e oseltamivir (Tamiflu) inibem a liberação do vírus das células hospedeiras. São específicos para a proteína neuraminidase do vírus da influenza; impedem a liberação do vírus e portanto limitam a disseminação do vírus.

Glossário

Adjuvantes: São substâncias ou formulações químicas utilizadas para aumentar a resposta imune contra vacinas inativadas. Atuam pela retenção/deposição do imunógeno no local da inoculação, retardando a sua eliminação (efeito *depot*) e conseqüentemente retardando a sua liberação; o tempo de estimulação antigênica é prolongado e conseqüentemente aumentado. Alguns adjuvantes podem também estimular macrófagos, linfócitos e outras células envolvidas na resposta imunológica. Sais de metais, como aqueles de alumínio, emulsões de óleo (adjuvante de Freund) e vesículas lipídicas sintéticas (lipossomas) são também usados como adjuvantes.

Neuraminidase: Glicoproteína presente como projeção na superfície externa do envelope dos vírus da influenza. Cliva um inibidor da proteína hemaglutinina do vírus da influenza.

Direitos reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento núm. A3406.0306.PT

MÉTODOS EM VIROLOGIA:

Cultivo e caracterização viral

In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 28-Oct-2005; A3402.1005.PT

D.J. Wise¹ and G.R. Carter²

¹Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

²Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

Traduzido por: M. C. Speroto Brum, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. (28-Jun-2005).

Índice

- Métodos de propagação de vírus
- Purificação e concentração de vírus
- Armazenagem e infectividade
- Visualização de vírus
- Contagem direta de partículas víricas
- Contagem indireta de partículas víricas
- Alguns métodos empregados para a caracterização de vírus
- Glossário

Vários métodos para o armazenamento, visualização, quantificação (direta e indireta) e propagação de vírus foram desenvolvidos. Existem também métodos para a realização do diagnóstico de doenças produzidas pela infecções víricas, muitos deles são baseados em testes sorológicos, os quais detectam a resposta do hospedeiro ao agente.

Historicamente foi observado que alguns agente causadores de doenças poderiam passar através de filtros nos quais as bactérias eram retidas. Os filtrados quando inoculados em meios seletivos para bactérias apresentavam resultado negativo para esse microorganismo, porém mantinham a capacidade infectante e eventualmente continham vírus. Normalmente não é possível observar os vírus com o uso de microscópio óptico, com exceção dos poxvírus. A visualização de partículas víricas somente pode ser feita com o uso de microscópio eletrônico. Alguns métodos básicos aplicados para o estudo de vírus serão descritos abaixo.

Tabela 2.1. Importantes propriedades biológicas e físico-químicas de vírus envelopados e não-envelopados.		
Características	Vírus não envelopados	Vírus envelopados
Radiação ultravioleta	Sensível	Sensível
Radiação gamma	Sensível	Sensível
Termoestabilidade	Termoestável	Termosensível
Susceptibilidade aos cristais de gelo	Não	Extensiva
Inativação por solventes lipídicos e detergentes	Não	Sim

Como discutido anteriormente, existe uma considerável diversidade nas características físicas dos vírus de animais. A principal característica que reflete a diversidade viral é a presença ou ausência do

envelope. Como demonstrado na Tabela 2.1, os vírus não-envelopados de uma maneira geral são sensíveis a radiação ultravioleta, relativamente termoestáveis susceptíveis a danos produzidos pelos cristais de gelo.

Devido a presença de camada lipídica que compõe o envelope viral, os vírus envelopados são inativados por solventes lipídicos (clorofórmio e éter) e detergentes (deoxicolato), são sensíveis as radiações ultravioletas e gama, relativamente termosensíveis e mais facilmente danificados por cristais de gelo do que os vírus que não possuem envelope.

Métodos de propagação viral

Para o isolamento, caracterização, identificação e produção de vacinas uma considerável quantidade de partículas víricas é geralmente necessária. Isso pode ser obtido pela através de técnicas de propagação.

Inoculação de animais

Durante muito tempo a inoculação de susceptíveis foi única maneira de se obter grandes quantidades de vírus. Atualmente, o uso de animais para multiplicação de vírus é limitada devido a questões éticas. Somente utiliza-se animais para a amplificação viral para aqueles vírus que apresentam dificuldade de adaptação ao cultivo celular. Por exemplo, cepas vacinais do vírus da Enterite Hemorrágica dos Perus podem ser propagadas em animais ou em cultivo celular. No entanto, o uso de amostras oriundas do baço de aves parece ser mais empregada.

Com o propósito de diagnóstico, a inoculação de animais pode ser utilizada, em amostras suspeitas de raiva utiliza-se a inoculação de camundongos lactantes.

Inoculação de ovos embrionados

Previamente ao desenvolvimento das técnicas de cultivo celular, o uso de ovos embrionados para a propagação viral foi uma das primeiras alternativas na qual não se utilizava animais. A inoculação em ovos embrionados é um método amplamente utilizado para a propagação de vírus influenza tipo A e a maioria de vírus aviários. Esse sistema pode ser empregado para a diferenciação de alguns vírus que produzem lesões semelhantes, como vírus do cowpox e do pseudocowpox. No entanto, alguns vírus de mamíferos, como o vírus da Língua Azul, se adaptam bem a esse sistema que é rotineiramente utilizado para propagação, diagnóstico e pesquisa.

Algumas considerações devem ser tomadas quando do emprego dessa técnica, dentre elas a presença de anticorpos maternos (IgY) no saco da gema. Devido a isso, é indicado o uso de ovos oriundos de criatórios SPF (specific pathogen-free – livres de patógenos específicos). A constante passagem de viroses em ovos embrionados também é uma técnica de atenuação que pode ser aplicada para a obtenção de amostras virais utilizadas em vacinas vivas modificadas.

Cultura de células e tecidos

A cultura de tecidos refere-se ao crescimento e manutenção de tecidos vivos *in vitro*. Existem dois tipos básicos: cultivo de explante e cultivo celular. Cultivo de explantes são pequenos fragmentos de tecidos oriundos do hospedeiro e mantidos em cultivo, enquanto que o cultivo celular é resultado da dissociação do tecido em células individuais seguido de sua manutenção em cultivo. Vários sistemas utilizados em virologia são baseados no emprego de cultivos celulares e não no cultivo de tecidos, sendo muitas vezes ambos termos aplicados indiscriminadamente. O cultivo de células pode ser subdividido em cultivo primário, semi-contínuo e contínuo ou linhas celulares.

Cultivos de explante

São culturas de pequenos fragmentos de tecidos específicos retirados de animais. Cultivos de explante são úteis para isolamento viral e são necessários para o isolamento de alguns coronavírus. Demonstração de latência por alfa herpesvírus humanos e animais pode exigir o uso de cultivos de explantes de ganglios nervosos (trigêmeo).

Cultivo celular primário

Cultivo de células primárias são originados de tecidos frescos que foram submetidos ao tratamento com enzimas (tripsina ou outras proteases) para a individualização das células. Como resultado, esse tipo de cultivo muitas vezes é composto de vários tipos celulares. Nas condições *in vitro*, os cultivos primários raramente se dividem ou então o fazem a uma frequência muito baixa, isso é denominado como limite de

Hayflick. Portanto, são limitados quanto ao número de passagem, porém são ideais para o isolamento de alguns vírus. Cultivos primários raramente sobrevivem a 20 passagens in vitro.

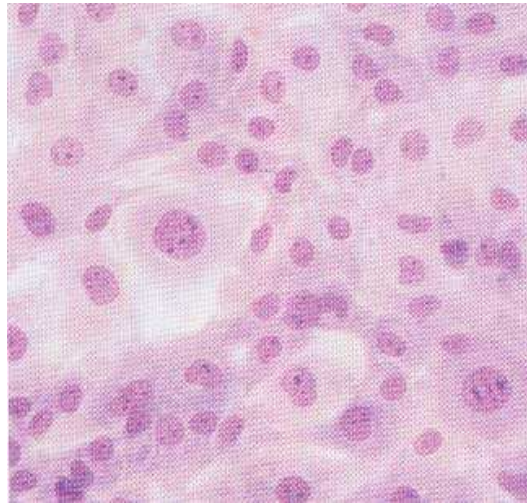


Figura 2-1. Cultivo celular normal. Cortesia do A. Wayne Roberts.

Cultivo semi-contínuo

Conhecido como linha celular diplóide, o cultivo semi-contínuo contém o número normal de cromossomos de uma célula diplóide da espécie da qual foi originado. Cultivos semi-contínuos são originados de cultivos primários na qual algumas células podem sobreviver mais que o limite de Hayflick. Esse tipo de cultivo geralmente sobrevive entre 30 e 50 passagens in vitro. No entanto, esses cultivos são amplamente para a propagação de uma grande variedade de vírus. Geralmente são compostos por fibroblastos.

Cultivo contínuo ou linhas celulares

As células desse tipo de cultivo apresentam um número anormal de cromossomos, sendo chamados de cultivos heteroplóides. Essas células são originadas de tecidos normais ou neoplásicos e são caracterizados pela habilidade de propagação indefinida in vitro. Geralmente, os cultivos contínuos ou linhas celulares são menos susceptíveis a propagação viral do que os cultivos primário ou semi-contínuo. Porém, possuem a facilidade de multiplicação em grande escala o que é benéfico para a pesquisa e produção de vacinas. Muitas linhas celulares estão disponíveis em repositórios, como o American Type Cell Culture (ATCC). Os laboratórios de virologia geralmente mantém estoques de linhas celulares com um baixo número de passagens, pois essas linhas contínuas são susceptíveis a alterações nas suas características. As alterações podem ser produzidas pela infecção com micoplasmas ou contaminação com alguns vírus (circovírus suíno e vírus da diarreia viral bovina).

Concentração e purificação viral

Após a adaptação e propagação inicial, os vírus podem ser separados dos debrís celulares e purificados. Isso é obtido após um número de processos que envolvem centrifugações (diferentes velocidades), diálise, precipitação, cromatografia e gradientes de densidades. O passo inicial desse processo é uma centrifugação diferencial (baixa velocidade) (~ 2000 x g) que é utilizada para remoção dos debrís celulares. O seguinte passo é uma centrifugação a alta velocidade (40 000 a 80 000 x g) que objetiva reduzir o volume da amostra, em alguns casos em que deseja reduzir o volume ainda mais pode ser feita uma concentração por diálise e precipitação com metanol ou polietilenoglicol realizada a baixa temperatura (-70°C). A purificação é obtida através de cromatografia ou centrifugação através de gradientes de densidade. Vírus envelopados podem ser purificados através da velocidade de sedimentação em gradientes de sacarose. Já os vírus não envelopados, podem ser purificados pela centrifugação em gradientes de cloreto de céσιο.

Infectividade e armazenamento

Infectividade

Infectividade é a habilidade que o vírus tem de infectar uma célula hospedeira. A temperatura exterior à célula hospedeira afeta diretamente a capacidade do vírus manter a sua infectividade, particularmente nos casos do vírus envelopados. Os vírus não possuem atividade metabólica própria, a infectividade é a maneira de avaliar a integridade da partícula após a exposição a determinadas temperaturas. Alguns parâmetros são considerados críticos:

- à 60°C, a infectividade irá diminuir rapidamente em segundos.
- à 37°C, a infectividade irá diminuir em minutos.
- à 20°C, infectividade irá diminuir em horas.
- a infectividade, à temperaturas acima citadas, irá influenciar a transmissão pelo contato direto (à 37°C) e pelos fomites (à 20°C).
- à 4°C, a infectividade nos tecidos é mantida por dias. Clínicos devem estar atentos para esse tipo de amostra clínica.

Temperaturas abaixo da temperatura de congelamento são usadas para armazenamento de vírus durante prolongados períodos. Nesse caso é importante manter a formação de cristais de gelo à níveis mínimos. Deve ser considerado que a resistência e labilidade varia muito entre os vírus. Alguns são capazes de resistir por horas, dias, ou até meses em condições ambientais, enquanto outros são inativados em minutos sob condições semelhantes.

Três métodos principais de conservação de vírus são:

- congelamento à -70°C com ou sem criopreservantes.
- congelamento à -196°C nitrogênio líquido, para armazenamento por um longo período de tempo.
- liofilização ou congelamento a seco, podendo ser estocados a temperatura ambiente ou congeladores convencionais.

Visualização de vírus

Os dois métodos mais utilizados para visualizar a estrutura e morfologia dos vírus são a microscopia eletrônica e microscopia de força atômica. Outros tipos de microscopia são empregados para observar as alterações celulares induzidas pela replicação viral. Sem as técnicas de visualização dos vírus existe uma dificuldade muito grande em se estudar a estrutura ou a interação vírus-célula. A capacidade de visualização das partículas permitiu se estimar o número de partículas presentes em uma suspensão. Alguns métodos permitem estimar o número de partículas presente em uma solução de forma indireta. Em ambos os casos, direta ou indireta, a quantificação é sempre uma estimativa. A estimativa é importante na preparação de vacinas, na determinação do número mínimo para produção de doença ou em investigação viral.

Microscopia óptica

Com o uso da microscopia óptica não é possível a observação das partículas víricas, com exceção dos poxvírus, esta técnica pode ser utilizada para a observação do efeito da infecção viral na célula hospedeira. A alteração ou destruição causada pelo vírus na célula é referido como efeito citopático (CPE). Os efeitos citopáticos observáveis incluem:

1. arredondamento celular e agregados semelhantes a cachos de uva. Ex.: adenovírus
2. arredondamento celular, retração celular, ruptura com a liberação de debris celulares. Ex.: enterovirus
3. entumescimento e arredondamento celular em áreas localizadas. Ex.: herpesvírus
4. fusão de várias células e formação de células gigantes multinucleadas (sincício). Ex.: paramixovírus

Adicionalmente, a formação de corpúsculos de inclusão pode ser observada, sendo características de alguns vírus.

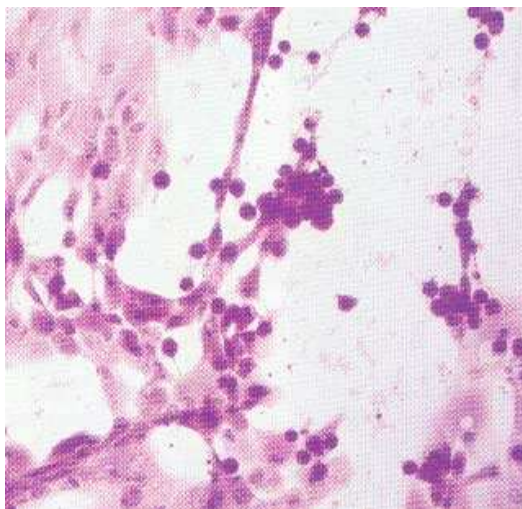


Figura 2-2. Efeito citopático de um herpesvírus equino "lento". Cortesia do A. Wayne Roberts.

Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência pode ser utilizada para a visualização de células ou tecidos infectados por vírus, nesse caso emprega-se anticorpos específicos para o antígeno associados a um fluorocromo (geralmente fluoresceína). Os anticorpos ligam-se especificamente nos antígenos virais dentro das células ou tecidos. A visualização é possível após a excitação do fluorocromo com a luz ultravioleta (UV) do microscópio de fluorescência, na qual se observam as áreas coloridas localizadas em um fundo relativamente escuro. Alternativamente, a visualização pode ser realizada indiretamente através do uso de anticorpos não marcados (específicos para o antígeno, como os soro de animais convalescentes), seguido do uso de um anticorpo marcado com o fluorocromo que reconhece o primeiro anticorpo. As técnicas que utilizam anticorpos fluorescentes são rotineiramente usadas no diagnóstico e pesquisa viral.

Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica emprega a aceleração dos elétrons com grande energia e magnéticamente, tornando possível a visualização da amostra. Os elétrons com alta energia possuem comprimentos de ondas curtos e isso faz com se obtenha uma melhor resolução de estruturas muito pequenas. A microscopia eletrônica possui resolução capaz de se visualizar grandes polímeros, como DNA, RNA e grande proteínas. Para facilitar a visualização, as amostras podem ser previamente tratadas com metais pesados, como o ósmio. Os elétrons chocam com o metal, os quais são visualizados na tela fluorescente. Com microscopia eletrônica é possível a obtenção de imagens tridimensionais dos vírus e de sua localização dentro da célula hospedeira (núcleo ou citoplasma) em um determinado momento após a infecção. Como as amostras são tratadas com metais pesados, a observação dos vírus em células vivas não é possível.

Microscopia atômica de força

A microscopia de atômica de força mede a propriedades locais (tamanho, absorção, magnetismo, etc.) mediante a proximidade da sonda com a amostra. Isso faz com que seja possível medir pequenas áreas da amostra. Os elétrons são impulsionados entre os átomos, resultando em uma pequena, mas mensurável força. O resultado da força medida é transformado no contorno da superfície da estrutura analisada. A vantagem da microscopia atômica de força é o uso de células ou tecidos vivos e de requerer uma quantidade mínima de amostra. Esse método tem sido útil para imagens detalhadas de estruturas de capsídeos e de interações entre o vírus e a célula.

Microscopia imunoeletrônica

Essa técnica permite a visualização do complexo antígeno/anticorpo que é específico para determinado vírus. Nesse método, seções ultrafinas da amostra são preparadas e incubadas com um anticorpo específico para o vírus. Depois de seguidas lavagens, a seção é incubada com proteína A conjugada com partículas de ouro (com um tamanho variando entre 5 e 20 nm). A proteína A liga-se à região Fc do anticorpo e a detecção é feita com o uso da microscopia eletrônica.

Contagem direta de vírus

A contagem do número de partículas víricas possui importância na pesquisa e produção de vacinas. A microscopia eletrônica é usada para contagem de partículas víricas em soluções livres de vírus. Um determinado volume de amostra é examinado e os vírus são contados. Esse número é então empregado para se fazer uma estimativa do número total de partículas na amostra. Uma limitação desse método é que capsídeos vazios, partículas não infecciosas, são contadas. O número de partículas infecciosas e o número total são comparados possibilitando o estabelecimento de uma relação partículas totais/partículas infecciosas para uma determinada preparação de um vírus.

Contagem indireta de vírus

Os métodos de contagem indiretos utilizam fatores associados com a infectividade (atividade biológica). Os três principais métodos utilizados para a determinação da concentração viral são: provas de hemaglutinação, prova de formação de placas e o método da diluição limitante.

Hemaglutinação

A prova de hemaglutinação é baseada na propriedade que muitos vírus envelopados têm de aglutinar eritrócitos. O teste é realizado em microplacas e consiste da adição de células vermelhas à diferentes concentrações do vírus, após um período de incubação observa-se a hemaglutinação. A hemaglutinação é o resultado da ligação de várias partículas víricas à superfície do eritrócito. Por exemplo, são necessários 10.000 partículas víricas de influenza por cada unidade hemaglutinante (HA). Uma HA é definida como a maior diluição da amostra viral que produz hemaglutinação completa. A hemaglutinação é empregada para a concentração e purificação de alguns vírus, e também como um teste auxiliar na identificação de alguns vírus em amostras de cultivo celular e fluídos de embriões de galinhas. Especialmente de amostras víricas que não efeito citopatogênico ou então o fazem de forma discreta. Pode ser utilizada diretamente em amostras de fezes ou para determinados tipos de ensaios enzimáticos. Ensaios similares de atividade enzimática de um vírus em particular (como aqueles que possuem transcriptase reversa) podem ser realizados de maneira semelhante.

Unidade formadora de placas

Esta prova baseia-se na inoculação de células susceptíveis com uma amostra do vírus e através da sua atividade biológica pode-se estimar a quantidade de partículas. Nesse procedimento, diluições seriadas na base dez do vírus a ser testado são inoculadas em camadas celulares. Após o período de incubação que permite o vírus adsorver nas células, é adicionado um gel contendo agarose e meio de cultivo. O ágar previne a disseminação do vírus na cultura entre as células a uma grande distância, mas permite que ocorra uma transmissão célula-a-célula. Nos vírus citopáticos, as células infectadas serão destruídas formando um área clara indicando a morte celular após a um período de incubação que pode variar entre 24 - 72 horas. O cálculo do número de placas baseia-se na contagem do número de placas observadas, no fator de diluição e no volume de amostra usada para, resultando em Unidade Formadora de Placas por mililitro de amostra.

Método da diluição limitante

Esse ensaio é baseado na observação da presença da replicação viral in vitro como CPE após a exposição de diferentes diluições da amostra a ser testada. Quando possível, utiliza-se um vírus referência que possui a sua concentração pré-determinada como controle positivo. Dependendo do vírus, realizam-se diluições seriadas na base dois ou na base dez e incuba-se com células susceptíveis. O título infeccioso (a recíproca da maior diluição capaz de infectar 50% das culturas celulares) é expresso como $DICC_{50}/ml$ (dose infectante para 50% dos cultivos celulares). Essa prova pode ser realizada com culturas celulares, ovos embrionados ou até mesmo com animais de laboratórios.

Diferentes métodos usados para caracterização

Existem algumas técnicas utilizadas em virologia que são auxiliares na identificação e classificação de amostras desconhecidas de vírus. Algumas das técnicas serão rapidamente citadas, mas se possuem especial interesse no diagnóstico ou pesquisa de algum particular vírus serão descritas com mais detalhes na ocasião apropriada.

Sensibilidade a solventes lipídicos

A sensibilidade de alguns vírus aos solventes lipídicos, como clorofórmio e éter, auxilia na taxonomia de alguns vírus. Todos os vírus que possuem envelope como a membrana externa são susceptíveis aos solventes lipídicos. Todos os vírus animais envelopados, com exceção de alguns poxvírus, são sensíveis ao éter.

Identificação do ácido nucléico

A identificação é realizada através da síntese do ácido nucleico na presença de inibidores da síntese do DNA, tais como 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU). Se a síntese viral for inibida, a multiplicação do vírus estará diminuída então do mesmo modo. Caso a multiplicação viral não for inibida, presume-se que o vírus contenha RNA como material genético.

Análise por enzimas de restrição

Enzimas de restrição são endonucleases (RE) que cortam o DNA de fita dupla em regiões específicas, variando de quatro a oito seqüências de bases palindrômicas. A análise por enzimas de restrição é particularmente útil para a definição do "subserotipo", na diferenciação entre vacina viva modificada e amostra virulenta, e estudo epidemiológico de surtos. O método baseia-se no tratamento do DNA viral com uma ou mais enzimas de restrição, seguido da separação dos fragmentos de acordo com o tamanho através de eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose. Os vírus RNA também podem ser analisados através desta técnica, porém primeiro deve ser sintetizado o DNA complementar (cDNA) a partir de RNA usando a enzima transcriptase reversa, seguido de uma amplificação do cDNA pelo uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Hemadsorção

Os ortomixovírus e paramixovírus obtêm a camada externa do envelope através do brotamento nas membranas celulares. Anteriormente ao brotamento, proteínas codificadas pelos vírus (hemaglutininas) são incorporadas na membrana celular. Isso fará com que os eritrócitos adsorvam na superfície celular, e resultando na formação de um foco de hemadsorção que poderá ser detectado microscopicamente.

Métodos imunológicos

Animais infectados com vírus respondem através da produção de anticorpos específicos. A detecção e avaliação desses anticorpos, os quais refletem o estado da doença, são utilizados para o planejamento de programas sanitários em rebanhos e em estudos epidemiológicos de surtos. A detecção dos anticorpos é também empregada no diagnóstico de doenças, e isso é muitas vezes um processo demorado que requer a avaliação dos níveis de anticorpos na fase aguda e convalescente, geralmente coletados num intervalo de 10 a 14 dias. Uma medida mais rápida é utilizar anticorpos específicos (soro hiperimune) para detectar os antígenos virais diretamente nas amostras clínicas. Esses anticorpos são obtidos através da hiperimunização de coelhos ou cabras com vírus. Outra alternativa que podem ser empregada são os anticorpos monoclonais, se disponíveis.

Anticorpos monoclonais (mAbs) são preparados em camundongos após a sua exposição com o antígeno viral, esses desenvolverão linfócitos B específicos no baço. Essas células serão coletadas e fusionadas quimicamente com a uma linhagem celular de plasmocitomas de camundongos que secretam IgG. Essas células híbridas são então selecionadas e clonadas, resultando os hibridomas, esses serão analisados quanto a secreção de anticorpos específicos para o antígeno viral. Os hibridomas selecionados são injetados no peritônio de camundongos, onde essas células irão multiplicar rapidamente, resultando no acúmulo de fluido ascítico contendo altas concentrações do anticorpo monoclonal. A figura 2-1 descreve os passos envolvidos na preparação de anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais são utilizados na tipificação e subtipificação viral. Quando ligados a substâncias fluorocromos, os mAbs são utilizados na detecção de antígenos virais em tecidos. Os mAbs são também usados em testes de ELISAs para a identificação de vírus.

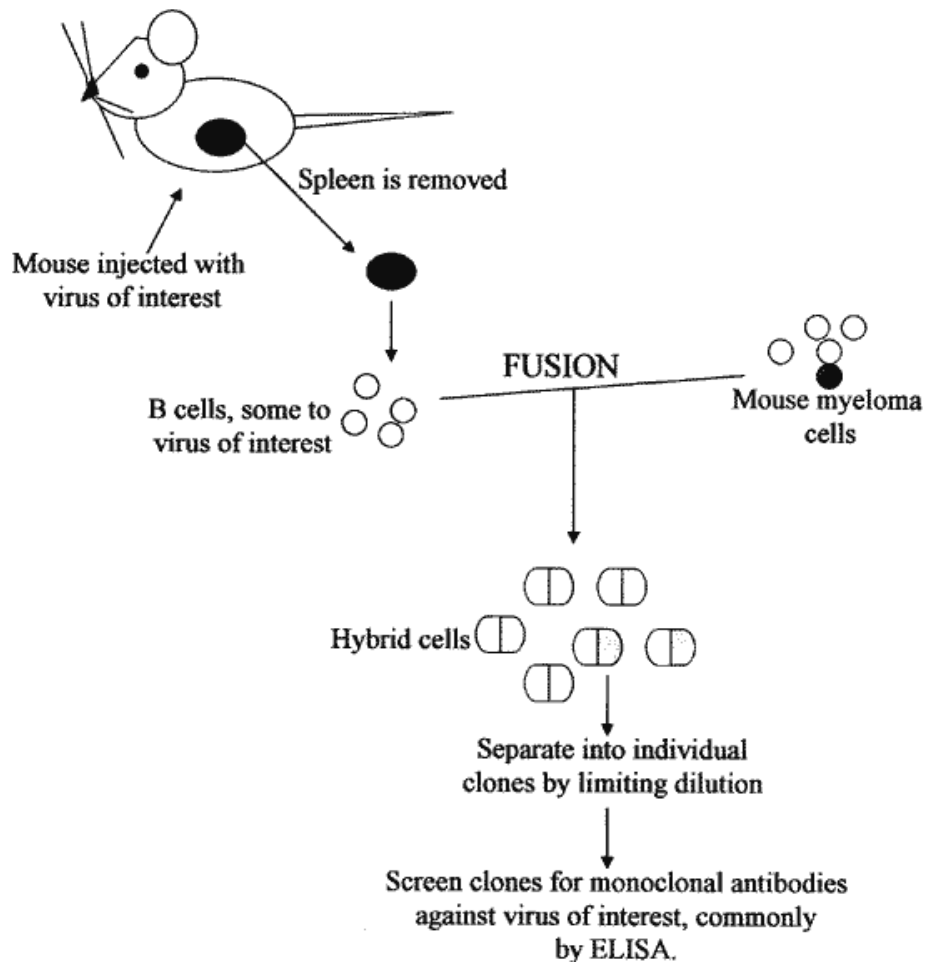


Figura 2-3. Os passos associados com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos.

Glossário

Vírus citopático: são vírus que alteram a aparência das células em cultura. As alterações podem incluir arredondamento, fusão, lise e liberação e produção de corpúsculos de inclusão.

Gradiente de densidade: este procedimento é empregado para separação das células ou moléculas grandes, como proteínas e ácidos nucléicos, pela centrifugação através de um gradiente de densidade. O gradiente consiste de uma solução (geralmente por sacarose ou cloreto de cézio) formada por várias densidades, sendo a menos concentrada na superfície e a de maior concentração no fundo. Devido a centrifugação as células e moléculas movem-se através do gradiente e formam bandas na densidade onde sua gravidade é igual ao do meio.

Palindrômicas: são seqüências de DNA que a leitura é a mesma em ambas as direções. A maioria dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição são palindrômicas. Ex.: o sítio de reconhecimento da EcoRI (E. coli) é:



Direiros reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento núm. A3402.1005.PT

CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE VÍRUS (texto original do polígrafo):

- Inoculação de animais de experimentação;
- Inoculação de ovos embrionados;
- Cultivos celulares.

CULTIVOS CELULARES (1950)

Inicialmente, os vírus eram propagados através da inoculação de animais. Mais adiante, foi observado que **ovos embrionados** permitiam a multiplicação de uma série de vírus (ex. **Infuenza**, o vírus da gripe verdadeira). Até hoje, ovos embrionados são muito utilizados em virologia. Mais modernamente (embora animais ainda sejam muito utilizados em determinadas situações), devido a sua praticidade, para o cultivo e isolamento de vírus são utilizados cultivos celulares, que nada mais são do que células multiplicadas em suportes sólidos (ocasionalmente multiplicadas em suspensão). São eles classificados em:

- **Cultivos primários:** células diplóides, primariamente extraídas de órgãos e geralmente muito sensíveis à infecções com vírus de determinada espécie. São obtidos por dispersão das células com tripsina. São incapazes de se multiplicarem por mais do que 10-20 passagens em cultivos *in vitro*. Ex: cultivos primários de testículos ou rim de terneiro.
- **Linhas celulares:** células também são ainda diplóides, porém sofreram algumas modificações em sua carga genética que as torna capazes de atingir até 60-80 subcultivos *in vitro* também bastante sensíveis aos vírus (usualmente da espécie de origem destas células). Ex: células de turbinados bovinos (BT).
- **Linhagens celulares** ou **linhas celulares contínuas:** são células invariavelmente heteroplóides, com números bastante irregulares de cromossomos, com sensibilidade variável para determinados vírus, porém capazes de serem propagadas *in vitro* por um número indefinido de passagens.

Os cultivos celulares de células destes tipos acima mencionados normalmente não se multiplicam em suspensão. Necessitam estar aderidas a um suporte sólido para seu crescimento (tal como uma garrafa ou plástico), caso contrário, não são capazes de multiplicar-se; apresentam-se normalmente como uma única camada de células, denominada "monocamada" ou "monolayer".

Observação: Existem células capazes de crescer em suspensão, mas estas são usadas somente em situações especiais, como a produção de vacinas, onde o vírus já é bastante conhecido e faz-se necessária a produção de uma grande massa de antígeno. Geralmente não são utilizadas células em suspensão para o trabalho rotineiro de diagnóstico e pesquisa virológica. Por outro lado, são sempre preferíveis, quando possível, para a produção de grandes massas de antígeno viral.

Tipos de suportes para cultivos *in vitro*:

- **Vidro x plástico:** em geral as células se aderem a superfícies de vidro com facilidade. Certos tipos de vidro contém sais que não são adequados a permitir a aderência das células. Igualmente certos tipos de plástico devem ser tratados previamente (p.ex. com **poli-lisina** ou **plasma**) para permitir uma melhor aderência do tapete celular.
- **Garrafas fechadas x garrafas abertas:** Garrafas fechadas (ou seja, com a tampa bem fechada) contendo cultivos celulares fazem com que o próprio metabolismo celular gere condições de tamponamento adequadas ao crescimento das células. Por outro lado, **cultivos abertos** (garrafas abertas ou plásticos sem vedação adequada) tendem a levar à

alcalinização do meio pela entrada de oxigênio, levando a que as células não se multipliquem adequadamente. Por essa razão, cultivos abertos devem ser mantidos em **atmosfera contendo cerca de 5% de CO₂**, o que permite que ocorra um tamponamento adequado do meio, pela formação de HCO₃.

- **Garrafas estacionárias:** as células podem ser cultivadas em garrafas (de plástico ou vidro) estacionárias, ou seja, mantidas sobre uma superfície, sem sofrer movimentos.
- **Garrafas rolantes ("rollers"):** células também podem ser cultivadas em garrafas rolantes ou "rollers", onde as mesmas são mantidas sob rotação em um aparato apropriado.
- **Tubos de ensaio** (estacionários ou rolantes): como em garrafas, as células podem também ser cultivadas em tubos de ensaio (de plástico ou vidro), estacionários ou rolantes.
- **Tubos com lamínulas (tubos de Leighton):** tubos de ensaio contendo em seu interior uma lamínula são freqüentemente usados para o exame do crescimento de vírus sobre as lamínulas e posterior coloração das células infectadas.
- **Microplacas** (96, 24, 12 ou 6 orifícios) muito freqüentemente usadas hoje em dia: as placas de microtécnica ou microplacas são placas de plástico com orifícios de fundo chato. Cada orifício pode ser tratado como se fosse uma garrafa, ou um tubo, independente. Com uma microplaca podem ser feitas titulações de vírus e muitas outras provas, com um gasto mínimo de células e de meio de cultivo.

Como é feita a **DETECÇÃO DE INFECÇÕES VIRAIS?**

- 1- Através do **efeito** observado nos **animais inoculados (morte ou lesões)**.
- 2- Através do **efeito** sobre os **ovos embrionados (lesões na membrana corio-alantóide, mortalidade dos embriões)**.
- 3- Através do desenvolvimento de alterações nas células, chamadas efeito citopático ou efeito citopatogênico (ECP).

Os tipos de ECP variam: - **lise celular;**

- **necrose;**

- **apoptose;**

- **formação de inclusões;**

- **formação de sincícios (células gigantes multinucleadas);**

- **formação de vacúolos.**

- 4- Por algum método de **detecção de determinada proteína viral** (ex. a hemaglutinina do vírus da influenza, detectada por testes de hemaglutinação, ou a detecção da atividade de determinada enzima viral, **p.ex. a transcriptase reversa**).
- 5- Interferência por um vírus não citopatogênico (raramente usado hoje em dia).
- 6- Transformação morfológica por um vírus oncogênico (ex. vírus do sarcoma de Rous), normalmente acompanhada de perda de inibição por contato e aglomeração de células em grupos isolados.
- 7- **Através de testes imunquímicos:** Alguns vírus não causam lesões em cultivos celulares, sendo chamados "**vírus não-citopáticos**" (ex. vírus da Rubéola, ou alguns Pestivírus). Estes testes são hoje em dia muito frequentemente usados.

- 8- Através da visualização do vírus por microscopia eletrônica (não muito comum, pois dependem de uma concentração elevada de vírus e - o que é mais complicado - da disponibilidade de um microscópio eletrônico).
- 9- **Danos aos cromossomos:** desarranjo do cariótipo pode ser consequência de algumas infecções virais. Fragmentações, rearranjos, trocas e anormalidades cromossômicas podem ser detectadas.
- 10- **Indução de apoptose:** vários vírus são capazes de induzir apoptose (morte celular programada).

QUANTIFICAÇÃO DOS VÍRUS:

Métodos físicos:

- 1- **Contagem de partículas no microscópio eletrônico:** Os vírus podem ser contados a partir de uma preparação ao microscópio eletrônico, se comparados com uma suspensão de partículas de látex de tamanho semelhante. O inconveniente desse tipo de contagem é que ela reflete o número de partículas fisicamente presentes na preparação, mas não esclarece quantas delas são viáveis ou infecciosas. A infecciosidade, entretanto, é avaliada por outros métodos, comentados abaixo.
- 2- **Ensaio físico baseado em propriedades conferidas por proteínas virais:** alguns vírus contêm proteínas que lhes conferem propriedades relativamente fáceis de serem quantificadas. Uma delas é a hemaglutinação, propriedade pela qual um determinado vírus é capaz de aglutinar hemácias. Isto fornece um método simples de determinar a quantidade do agente infeccioso presente na preparação. Igualmente aqui não é possível determinar o número físico de partículas virais necessárias para causar a aglutinação de um determinado número de hemácias; não obstante, usualmente a hemaglutinação se correlaciona adequadamente com a quantidade de unidades infecciosas presentes na preparação de vírus.
- 3- **Testes envolvendo reações do tipo antígeno-anticorpo:** são freqüentemente utilizados para quantificar os vírus presentes em uma preparação. Igualmente, é necessário estabelecer uma correlação entre testes e o número de partículas infecciosas, ou, melhor dizendo, unidades infecciosas, presentes na preparação. Exemplos desse tipo de teste são a **imunofluorescência** ou os testes imunoenzimáticos denominados "ELISAs".
- 4- **Ensaio molecular:** baseado na quantificação do genoma viral em determinada preparação (ou paciente). Estes testes têm sido muito utilizados para o acompanhamento da evolução de pacientes com HIV e para o acompanhamento de outras enfermidades víricas onde o cultivo do agente é mais demorado ou difícil. Exemplo desse tipo é a PCR quantitativa ou "real time PCR", onde a quantidade de produto amplificado está relacionada à quantidade de genoma viral presente na amostra.

Ensaio baseado em infectividade:

Estes ensaios são baseados na capacidade do vírus infectar determinado cultivo, ou causar determinada lesão, ou ainda causar a morte do hospedeiro (exemplos: morte de embriões de galinha). Em cultivos celulares, este tipo de teste determina a capacidade de determinado vírus de causar ECP. Na maioria dos casos, hoje em dia estes são os ensaios utilizados com maior

freqüência. Para realizá-los, são feitas diluições seriadas da suspensão de vírus, usualmente utilizando o fator de diluição 10 (ex: 1/10 ou 10^{-1} , 1/100², 1/1000 ou 10^{-3} = e assim por diante). Estas diluições são subseqüentemente inoculadas em cultivos celulares apropriados, usualmente com quatro ou mais repetições (ou seja, 4 camundongos, ou 4 tubos, ou ainda 4 orifícios de uma placa de microtécnica) por diluição.

Em alguns sistemas (p.ex. sistema de plaqueio), após a infecção dos cultivos, adiciona-se uma camada de um meio semi-sólido sobre as células, a fim de permitir a visualização de "placas", originadas da multiplicação do vírus em determinados pontos da monocamada, que por encontrarem-se sob o meio semi-sólido não tendem a espalhar-se com grande rapidez, permitindo a visualização das placas.

Após determinado período de incubação do vírus em cultivo, os cultivos são examinados e quantifica-se o ECP por contagem dos poços onde o efeito ocorreu, ou utiliza-se um método imunológico (ex. imunoperoxidase) para a detecção dos cultivos infectados.

Interações vírus-célula e patogenia viral

In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 8-Feb-2005; A3404.0205.PT

D.J. Wise¹ and G.R. Carter²

¹Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

²Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

Traduzido por: [E. F. Flores](#), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. (28-Sep-2005).

Índice

- Interações entre vírus e células hospedeiras
- Patogenia das infecções víricas
- Glossário

O conhecimento da genética e replicação viral é necessário para entender as interações entre os vírus e as células hospedeiras. As interações a nível celular e a progressão de uma infecção viral em particular determina a patogenia da enfermidade e as manifestações clínicas. A resposta imunológica do hospedeiro à infecção viral é apresentada anteriormente.

Interações entre vírus e células hospedeiras

As interações entre os vírus e as suas células hospedeiras está intimamente ligada ao ciclo replicativo do vírus. As interações do vírus com os componentes e organelas celulares durante a replicação determinam como os vírus causam doenças. Em geral, existem quatro possíveis efeitos primários de uma infecção vírica em uma célula hospedeira. A maioria das infecções não causa alterações patológicas ou morfológicas aparentes na célula; entretanto a replicação pode causar citopatologia (arredondamento celular, desprendimento do tapete, formação de sincícios, etc.), transformação maligna ou lise celular (morte).

Morte celular

A morte celular durante a replicação pode ocorrer por vários fatores. A causa mais comum parece ser a inibição da síntese basal de macromoléculas, como proteínas. Durante a replicação, o vírus induz a maquinaria celular a produzir principalmente produtos virais em detrimento dos produtos necessários à sobrevivência da célula. Com isso, estes não estão em quantidades suficientes para manter a sua viabilidade. Além da falta de produtos essenciais, esses eventos resultam em acúmulo excessivo de produtos virais (RNA, DNA, proteínas), que podem ser tóxicos para a célula. Na fase de liberação/egresso do ciclo replicativo de alguns vírus apoptose é estimulada. Em outros casos, a inibição da síntese de macromoléculas celulares provoca danos nas membranas lisossomais e liberação de enzimas hidrolíticas, resultando em morte celular.

Efeitos celulares

Efeito citopático (ECP) refere-se a quaisquer alterações morfológicas celulares resultantes de infecção vírica. Células infectadas podem ter a sua membrana plasmática alterada, e como resultado pode fusionar com a célula vizinha. Acredita-se que essas alterações de membrana que levam a fusão, são resultados da inserção de proteínas virais durante o ciclo replicativo. O resultado da fusão de várias células são células gigantes multinucleadas ou sincícios. A formação de sincícios é característica da replicação de alguns vírus envelopados como os herpesvírus e paramixovírus. A membrana celular também pode ficar alterada em sua permeabilidade, permitindo a entrada de íons, toxinas, antibióticos, etc. Essas células gigantes são algumas vezes chamadas de "células gigantes multinucleadas".

Outro aspecto do ECP é a ruptura do cito-esqueleto, levando ao arredondamento das células infectadas. Essas células podem então formar sincício ou morrer. A ocorrência de ECP em amostras clínicas indica a presença de vírus no material; e o ECP também é utilizado para a quantificação/enumeração viral em ensaios de placa.

A infecção de células com alguns vírus (poxvírus e vírus da raiva) é caracterizada pela formação de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos. Corpúsculos de inclusão são focos bem definidos que contêm proteínas e/ou partículas virais. Eles geralmente possuem localização e aparência bem determinadas, de acordo com o vírus.

Transformação maligna

Nesse processo, a infecção viral resulta em células caracterizadas por morfologia alterada, perda do controle do crescimento, propriedades biológicas e/ou químicas alteradas. Transformação maligna e neoplasia resultante podem ocorrer quando o genoma viral (ou parte) é incorporado no genoma do hospedeiro ou quando produtos virais são oncogênicos. Os vírus que causam transformação maligna são chamados vírus tumorais. Vírus de várias famílias têm demonstrado possuir capacidade de transformar células. Os vírus tumorais não possuem propriedades em comum (tamanho, estrutura, composição) além da capacidade de promover malignidade celular.

A transformação maligna é frequentemente caracterizada por alteração da morfologia celular. Isso inclui a perda da forma característica e assunção de uma forma arredondada, refrátil como descrita para ECP. Isso é o resultado de desagregação dos filamentos de actina e redução da adesão de superfície.

Alteração no crescimento celular, o marco da transformação maligna, é exibido em células que perdem a inibição de contato ou movimento, tem um reduzido requerimento por fatores de crescimento do soro e não respondem mais a sinais do ciclo celular.

Algumas propriedades apresentadas por células malignamente transformadas incluem a síntese contínua de DNA, alterações cromossômicas, surgimento de novos antígenos de superfície (ou antígenos embrionários), e aglutinação aumentada por lectinas.

Alterações bioquímicas em células malignamente transformadas incluem níveis reduzidos de AMP cíclico. AMP cíclico é o sinal químico associado com o controle do ciclo celular e mantendo-se os níveis baixos a célula se divide. Também envolvidos estão a secreção aumentada do ativador do plasminogênio (coagulação), fermentação para produção de ácido lático (efeito Warburg), perda de fibronectina e alterações nos componentes carboidratos das glicoproteínas e glicolipídios.

Oncogênese

Embora provas da causa-efeito tenham sido difíceis de obter, vários vírus DNA e RNA têm sido associados com transformação neoplásica. Os vírus implicados em oncogênese trazem consigo genes associados com crescimento celular e proliferação ou alteram a expressão da cópia celular do gene. Genes afetados incluem aqueles que estimulam e/ou inibem o crescimento celular.

Os genes virais que transformam as células infectadas são chamados de oncogenes (v-*onc* genes), que estimulam a multiplicação e proliferação celular descontrolada. A descoberta dos oncogenes virais levou a outra descoberta: que as células contêm genes análogos, chamados proto-oncogenes (c-*onc* genes), que estão normalmente em repouso, mas que podem ser ativados em alguma fase do desenvolvimento celular. Proto-oncogenes celulares incluem genes que codificam fatores de crescimento, fatores de transcrição e receptores de fatores de crescimento.

Vírus DNA envolvidos com oncogênese incluem o vírus da doença de Marek (Herpesviridae) e os papilomavírus orais bovino, equino e canino (Papillomaviridae). Esses vírus possuem genomas circulares epissomais (independentes do cromossoma celular, ao invés de integrados). Os oncogenes (v-*onc*) codificam proteínas associadas com o ciclo replicativo do vírus.

Vírus RNA associados com oncogênese incluem membros da família Retroviridae (e.g. vírus da leucose aviária e vírus da leucemia felina). Esses vírus integram seus genomas (ou uma cópia do genoma) no cromossoma da célula hospedeira, chamados de provírus ou DNA proviral. Integração viral é mediada pelas extremidades do genoma, chamados de LTRs (repetições terminais longas). Os LTRs contêm promotores/enhancers, além das seqüências envolvidas na integração do provírus no genoma do hospedeiro. Os retrovírus podem causar oncogênese codificando seus próprios oncogenes ou por alteração na expressão de oncogenes celulares ou proto-oncogenes causada pela inserção do provírus no cromossoma celular próximo a esses genes.

Ausência de alterações morfológicas ou funcionais

Algumas vezes, a infecção e produção de progênie viral podem ocorrer sem alterações detectáveis na célula hospedeira. Isso é chamado de infecção endossimbótica. Isto provavelmente depende das necessidades replicativa de cada vírus. Muito provavelmente o vírus necessita funções celulares que já estejam ativas para a replicação e, portanto não necessita alterar funções da célula.

Patogenia das infecções víricas

Patogenia refere-se à origem e mecanismos de produção das doenças. Infecções víricas podem ser agudas, crônicas, latentes ou persistentes. A primeira etapa no processo da doença é a exposição.

Exposição e transmissão

A exposição pode ocorrer pelo contato direto com um animal infectado, por contato indireto com secreções/excreções de um animal infectado, ou através de vetores mecânicos ou biológicos. Transmissão do vírus da mãe para a progênie (transplacentária, perinatal, colostro) é chamada transmissão vertical. As outras formas de transmissão são chamadas de transmissão horizontal. A reativação de um vírus latente, não replicando, pode ocorrer em um indivíduo sem necessidade de sofrer infecção do vírus de uma fonte de infecção externa.

Porta de entrada (via de penetração)

Os vírus podem penetrar no hospedeiro através do trato respiratório (gotículas em aerossóis), trato digestivo (contaminação oro-fecal), trato gênito-urinário (cópula, inseminação artificial), conjuntiva (gotículas em aerossóis) e através de lesões de pele (arranhões, agulhas, picadas de insetos). O estabelecimento ou não da infecção depende da capacidade do vírus encontrar e infectar células susceptíveis. A susceptibilidade de um hospedeiro a um determinado vírus depende essencialmente de receptores celulares, que permitem a ligação e posterior internalização do vírus.

Infecções localizadas e sistêmicas

Após a infecção, o vírus replica em tecidos próximos (ou no próprio) ao local de entrada (replicação primária). Alguns vírus permanecem confinados a esse local e produzem infecções localizadas. Um exemplo são os resfriados comuns de humanos e infecções semelhantes em animais causadas pelos rinovírus.

Outros vírus produzem infecções disseminadas (sistêmicas) pela disseminação a outros órgãos pela via sanguínea, linfática ou nervosa. A disseminação inicial de um vírus pelo sangue é denominada de viremia primária. A viremia pode ocorrer com vírus livre no plasma ou por vírus associado à células sanguíneas. Após replicação nesses órgãos, pode haver mais uma etapa de viremia e disseminação aos órgãos-alvo.

Um bom exemplo de vírus que causa infecção sistêmica é o vírus da doença de Teschen de suínos (teschovírus suíno 1). O vírus é transmitido pela via fecal-oral. Inicialmente replica nas células das tonsilas e migra para o intestino e linfonodos mesentéricos. Desses linfonodos, o vírus penetra em nervos e invade o sistema nervoso central (CNS). Uma vez no CNS induz sinais neurológicos como ataxia, tremores, incoordenação, rigidez dos membros, convulsões, paralisia e coma. A predileção de um vírus por determinado tecido ou tipo de célula é denominada tropismo.

Mecanismos de infecções virais

A replicação viral nos órgãos-alvo ocasiona lesões celulares. O número de células infectadas/afetadas e a extensão das lesões podem resultar em disfunção tecidual/orgânica e em manifestações clínicas de doença. O intervalo entre a penetração inicial do agente e o início dos sinais clínicos é denominado de período de incubação. O período de incubação é curto em infecções nas quais o vírus replica na porta de entrada (exemplo: influenza) e mais longo nas infecções generalizadas (cinomose). Alguns vírus infectam

animais sem provocar qualquer sintomatologia clínica. Essas infecções são denominadas infecções subclínicas (assintomáticas ou inaparentes). Existem numerosos fatores que podem influenciar o resultado de uma infecção viral. Esses incluem imunidade pré-existente, fatores genéticos do animal, idade, fatores relacionados ao estresse (nutrição, alojamento, etc.). Os mecanismos de produção das doenças por vírus são muito complexos. A doença pode resultar dos efeitos diretos do vírus nas células do hospedeiro, como morte celular, ECP e transformação maligna. Alternativamente, a doença pode ser resultado da resposta fisiológica e imunológica do hospedeiro.

Um exemplo de efeitos fisiológicos indiretos é a infecção por rotavírus, que causa diarreias em crianças e animais jovens. A diarreia pode ser causada pela infecção de células eritrocíticas que são estimuladas a produzir citoquinas, levando a estimulação de neurônios intestinais e secreção excessiva de líquidos e eletrólitos na luz do intestino grosso.

Um exemplo de resposta imunológica mediando a patogenia de uma infecção viral é a doença de Borna, em equinos. O vírus dissemina-se do CNS para nervos periféricos através de axônios. O hospedeiro responde à presença de neurônios infectados montando uma resposta imunológica mediada por células. Macrófagos, neutrófilos e linfócitos T citotóxicos específicos são ativados para destruir os neurônios infectados com o vírus de Borna. Isso resulta em inflamação crônica do CNS que leva a manifestação de sinais neurológicos associados.

Dois termos importantes utilizados na discussão de infecções por vírus e bactérias são patogenicidade e virulência. Patogenicidade refere-se à capacidade do vírus ou outro micrororganismo/parasita de causar doença. Virulência refere-se ao grau de patogenicidade. Vírus avirulento é aquele incapaz de causar doença. Um vírus atenuado é aquele cuja capacidade de causar doença foi reduzida geralmente por múltiplas passagens em cultivo celular, ovos embrionados ou animais.

Excreção viral

A excreção é o mecanismo utilizado para liberar a progênie viral do hospedeiro infectado com a finalidade de infectar novos hospedeiros e assim manter o vírus na população de hospedeiros. Os vírus são excretados principalmente pelas aberturas e cavidades corporais. Em infecções localizadas, o vírus é excretado no mesmo local utilizado para invadir o animal (a porta de entrada). Em infecções generalizadas, o vírus pode ser excretado por várias vias. Nem todos os vírus são excretados pelos seus hospedeiros. Esses incluem alguns vírus que replicam no CNS, como em encefalites, e em hospedeiros terminais.

Escape (evasão) do sistema imune

Na tentativa de controlar ou eliminar a infecção, o hospedeiro inicia uma resposta inflamatória. Os principais componentes dessa resposta são os interferons, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B produtores de anticorpos, várias moléculas efetoras e o complemento. Esses componentes atuam em conjunto e sinergisticamente para tentar eliminar o vírus do organismo.

Nesse esforço de eliminar o vírus, a resposta inflamatória pode causar muitas das lesões e sinais clínicos observados nas infecções víricas. A resposta imunológica do hospedeiro a vírus foi discutida anteriormente. Interferons (α e β) são produzidos por células infectadas pelo vírus. Eles atuam para impedir a continuação da replicação viral na célula infectada e nas células vizinhas. Os interferons também aumentam a expressão de antígenos virais nas células infectadas, facilitando o reconhecimento por linfócitos T citotóxicos. Alguns vírus (adenovírus) produzem RNAs que bloqueiam a fosforilação de um fator de iniciação, reduzindo a capacidade do interferon em bloquear a replicação viral.

Linfócitos T citotóxicos destroem células infectadas por vírus através da liberação de perforinas, que produzem poros na célula infectada. As granzimas são então liberadas dentro da célula infectada, induzindo a degradação de componentes celulares. Finalmente, os linfócitos T citotóxicos induzem apoptose das células hospedeiras infectadas.

Alguns vírus reduzem a expressão de antígenos do MHC classe I (MHC-I) na superfície das células hospedeiras (citomegalovírus, herpesvírus bovino tipo 1, adenovírus). Como os linfócitos T citotóxicos não são capazes de detectar antígenos virais que não estejam associados ao MHC-I, as células infectadas não são detectadas e não são destruídas, permitindo ao vírus persistir no hospedeiro. No entanto, células com expressão reduzida ou nula do MHC-I podem ser reconhecidas pelas células natural killer (NK), que as destroem de maneira similar aos linfócitos T citotóxicos.

Linfócitos B secretam anticorpos específicos que neutralizam os vírions quando são estes liberados das células. Os complexos antígeno-anticorpo, por sua vez, pode ativar o sistema complemento.

O complemento auxilia na resposta, estimulando a inflamação e a neutralização/inativação viral e destruição de células infectadas.

As várias moléculas efetoras (citocinas) que são produzidas por células do sistema imunológico desempenham múltiplas funções, incluindo a indução de febre e atração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) ao local de injúria tecidual. Alguns vírus expressam proteínas homólogas aos receptores de citocinas (o vírus vaccínia expressa e libera receptores para a interleucina 1 (IL-1), que estimula a febre). Quando as células do sistema imunológico produzem IL-1, grande parte dessa liga-se ao vírus. Isso reduz a quantidade da IL-1 disponível para mediar seus efeitos biológicos. Isso contribui para aumentar o tempo de sobrevivência do vírus no hospedeiro. Outro mecanismo para escapar do sistema imune é possuir vários tipos antigenicamente diferentes (sorotipos). Uma resposta imunológica contra um sorotipo não protege necessariamente contra outros sorotipos do mesmo vírus. Por exemplo, existem mais de 100 sorotipos diferentes do rinovírus e 24 sorotipos do vírus da língua azul.

Infecções virais persistentes

Alguns vírus possuem a habilidade de resistir a resposta imunológica do hospedeiro e produzir infecções persistentes. Isso pode ser obtido por vários mecanismos, incluindo a destruição de linfócitos T causando imunossupressão, o escape de vigilância imunológica através da alteração dos antígenos de superfície e a inibição da produção de interferon.

Existem três tipos clínicos principais de infecções persistentes:

Infecções crônicas

Os hospedeiros produzem e excretam grandes quantidades do vírus continuamente, por um longo período. Como consequência, o vírus pode ser continuamente transmitido a outros indivíduos. Alguns portadores crônicos são assintomáticos ou manifestam sinais leves da doença. Exemplos são a infecção pelo vírus da arterite viral equina, panleucopenia felina e poliomavírus aviário.

Infecções latentes

Nesse tipo de infecção, o vírus é mantido no hospedeiro em uma forma não-produtiva. Os herpesvírus são os exemplos mais clássicos. O genoma viral é mantido em neurônios sob uma forma circular fechada e periodicamente reativado (geralmente sob condições de estresse) resultando em replicação produtiva e excreção viral. Infecções latentes também ocorrem com retrovírus nos quais o genoma é integrado no genoma da célula hospedeira. Transformação celular e malignidade podem resultar se a integração do transcrito viral causa alterações do controle do ciclo celular.

Infecções por vírus lentos

Esse termo refere-se às infecções cujos períodos entre a infecção e o início da doença são muito longos. Nesses casos, a replicação viral não é lenta, mas o período de incubação e a progressão da doença sim. Um exemplo é a panencefalite esclerosante subaguda, que se desenvolve vários anos após a infecção com o vírus do sarampo (paramixovírus). A encefalite do cão velho, devida à recrudescência do vírus da cinomose, parece ser uma condição semelhante.

Glossário

Antígeno: Substância, geralmente exógena ao organismo – mas ocasionalmente em seu interior -, que o sistema imune reconhece como estranha ou não-própria. Quando é reconhecida induz uma resposta de anticorpos específicos contra ela.

Apoptose: Uma forma de morte celular programada, caracterizada por fragmentação do DNA nuclear.

Citocinas: Um grupo diverso de proteínas pequenas (<30 kilodaltons) solúveis, produzidas pelos leucócitos e que mediam várias funções na resposta imunológica.

Linfócitos T citotóxicos: Células que reconhecem fragmentos de proteínas virais associados com moléculas do MHC-I. São apenas efetivos para matar células que contêm antígenos estranhos.

Endossimbiótica: Forma de simbiose na qual um organismo vive no interior de outro.

Granzimas: Um grupo de proteases de serina, que penetram na célula-alvo através dos poros na membrana produzidos pelas perforinas, onde interagem com mecanismos celulares e mediam degradação de DNA e apoptose.

Interferons: Compreendem três tipos de proteínas (alfa, beta e gama). Todas as três formas possuem ação inespecífica contra vírus, mas os IFNs alfa e beta são mais potentes.

Interleucinas: Um grupo de citocinas produzidas por células efectoras do sistema imunológico e que atuam em outras células efectoras da resposta imunológica.

Lectinas: Glicoproteínas de plantas que ligam-se especificamente em certos açúcares, alguns dos quais presentes na superfície das células.

Macrófagos: São os principais fagócitos dos tecidos, órgãos e membranas serosas como a pleura e peritônio.

Antígenos do MHC classe I (MHC-I) (complexo maior de histocompatibilidade): Conjunto de genes que codificam proteínas marcadoras-próprias ou antígenos de incompatibilidade. Esses antígenos estão presentes na superfície de todas as células do organismo e servem para identificá-las como próprias e não estranhas ao organismo. Alguns tipos de antígenos do MHC estão presentes na superfície de células do sistema imune. A região dos genes do MHC em humanos é chamada de HLA (human leucocyte antigen) e está localizada no cromossomo 6.

Células naturalmente assassinas (natural killer, NK): Linfócitos com atividade citotóxica, que compreendem aproximadamente 5 a 15% dos linfócitos circulantes, e não possuem os marcadores de linfócitos B e T. Possuem a capacidade de destruir certas células tumorais e células infectadas por vírus, que não apresentam moléculas de MHC na superfície celular e o mecanismo de destruição é semelhante ao utilizado pelos linfócitos T citotóxicos.

Neutrófilos: São células fagocíticas de vida curta que contêm grânulos com compostos bactericidas no seu interior; são os mais numerosos dos leucócitos circulantes (aproximadamente 60 a 70% em humanos). Microscopicamente, possuem um núcleo com forma irregular, bi- ou tri-lobulado, são também chamados leucócitos polimorfonucleares (PMNs).

Perforinas: São proteínas formadoras de poros que requerem a presença de cálcio para polimerizar e formar canais que atravessam a membrana plasmática das células alvo.

Direitos reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento núm. A3404.0205.PT

PATOGENIA DAS VIROSES (TEXTO ORIGINAL DO POLÍGRAFO)

Entende-se por **patogenia** (pato= doença; genia = geração): o mecanismo pelo qual um agente leva ao desenvolvimento de determinada doença. Em virologia, o estudo da patogenia das viroses é importante para descobrir o mecanismo pelos quais os vírus atacam o hospedeiro e causam enfermidade. O conhecimento da patogenia das infecções permite, por exemplo, facilitar a busca de novos métodos de prevenção (como novas vacinas) e tratamento (como novos quimioterápicos).

Patogenicidade: refere-se ao potencial de alguns microorganismos de causarem danos com maior ou menor gravidade em seus hospedeiros.

- A grande maioria dos vírus são apatogênicos. Na água do mar: até 10^7 partículas virais por ml. No solo, idem. **Não são virulentos**, não causando quaisquer danos ao hospedeiro durante um processo infeccioso.

Portanto, observe: os vírus são capazes de causar infecções, muitas vezes independente do fato de causarem doença.

Os vírus podem apresentar variantes ou amostras mais ou menos patogênicas.

Ex: gripe verdadeira ou Influenza: Três vírus distintos (A, B e C): porém as grandes pandemias têm sido sempre causadas por amostras do vírus do tipo “A”. O tipo A, portanto, é mais patogênico do que os vírus B e C.

- Existem também amostras de vírus completamente apatogênicas: é o caso de algumas amostras de vírus da Peste Suína Clássica, um vírus de tremenda importância na suinocultura, e os reovírus, que infectam o homem e diversas outras espécies.
- Amostras de vírus de baixa ou moderada patogenicidade são também chamadas amostras **atenuadas**. Muitas destas amostras são utilizadas como vacinas. Estas vacinas são chamadas vacinas com **vírus vivo modificado, ou vírus vivo atenuado**. Ex: vacina contra a varicela, contra a varíola (não mais usada).

*As amostras atenuadas, de baixa ou nenhuma patogenicidade, ocorrem na natureza. No entanto, podem também ser “criadas” em laboratório. Os métodos tradicionais de obtenção de amostras atenuadas incluem sucessivas passagens em cultivos celulares, ou passagens em células ou hospedeiros diferentes do hospedeiro natural, cultivos em temperaturas diferentes. A vacina contra a raiva do tipo **Flury** (o nome refere-se à pessoa de quem a amostra foi isolada), no passado largamente utilizada para a imunização de animais, foi atenuada por sucessivas passagens em ovos embrionados. Por outro lado, a amostra Bartha do vírus da Doença de Aujeszky dos suínos (ou “Pseudorraiva”) contém uma deleção naturalmente adquirida.*

- Variações na virulência ou patogenicidade das amostras são **um reflexo do processo natural de evolução**, que nos vírus é acelerado por sua composição simples, pelo tamanho diminuto de seu material genético e pela ausência de enzimas de reparo durante a multiplicação do genoma.
- Durante a multiplicação viral são geradas quantidades incalculáveis de genomas com pequenas mutações. As características antigênicas e genotípicas de um vírus são determinadas por aqueles que ocorrem em maior número. O conceito de “quasispécies”, ou seja, de que as populações virais são representativas de uma população onde determinado genótipo ocorre com maior frequência, será abordado no capítulo sobre multiplicação viral.

TRANSMISSÃO

A transmissão de infecções virais pode se dar:

- a) de pessoa a pessoa;
- b) de animal para animal;
- c) de animal para animal, porém com envolvimento eventual de pessoas (zoonoses);
- d) através de vetores artrópodos, eventualmente envolvendo pessoas ou animais.

As maneiras de transmissão de viroses podem ser definidas como segue:

1- **Contato ou Contágio** (contagioso= que pode ser adquirido por contato), que pode ser subdividido em: contato **direto** (ex. quando o vírus é transmitido diretamente de um indivíduo infectado para outro) e contato **indireto** (quando o vírus é transmitido através de fômites, objetos, água, alimentos ou locais contaminados, sem haver contato direto entre o indivíduo infectado e aquele que vai ser infectado).

Muitas vezes formas simples de transmissão de infecções passam despercebidas. Tomemos como exemplo os resfriados, que são transmitidos essencialmente de duas formas: através de aerossóis gerados por espirros (pelo ato de assuar o nariz, ou expelir ar com força para eliminar o muco, ou ainda pela fala, que geram partículas de muco ou perdigotos) contendo vírions, ou ainda através do contato com mãos contaminadas. Portanto, um espirro incontido, ou um aperto de mão, podem ser responsáveis pelo seu próximo resfriado!

Cabe aqui um outro comentário de caráter sócio-epidemiológico: Os agrupamentos de indivíduos facilitam a transmissão de infecções. Assim, são comuns infecções que se alastram em grupos de estudantes, em excursões e outras atividades que requeiram a formação de grupos.

Em animais mantidos em confinamento a transmissão de infecções é facilitada. Por isso, aves criadas em aviários modernos, suínos, cães mantidos em canis, bovinos confinados e quaisquer outros grupos de animais devem ser mantidos sob rígido controle sanitário.

Didaticamente, poder-se-ia incluir como uma forma de transmissão por contato a transmissão de infecções por via placentária, onde ocorre o evidente contato entre a mãe e o novo indivíduo que está sendo gerado. Este tipo de transmissão é chamado de **transmissão vertical**, isto é, aquela que ocorre por via placentária (ex. rubéola e citomegalovirose em humanos; parvovirose em suínos; pestivírus em bovinos e suínos). Normalmente, infecções transmitidas por via placentária são também transmitidas por alguma outra forma de contágio na vida extra-uterina. Infecções transmitidas após o nascimento são ditas infecções de **transmissão horizontal**.

Nas infecções virais, a transmissão horizontal é a forma mais comum de contágio.

Felizmente, nem todos os vírus cruzam a barreira placentária. Alguns, como os citados acima, são notórios por essa capacidade.

O resultado da infecção fetal pode variar de acordo com uma série de variáveis, que vão desde o tipo e virulência da amostra de vírus, até o momento exato da gestação em que ocorre a infecção fetal.

PENETRAÇÃO NO ORGANISMO:

O início do processo infeccioso: requer adsorção a células com receptores que permitam sua penetração. Isto se dá através das “portas de entrada” do organismo, representadas usualmente pela pele e mucosas.

- A maioria dos vírus ingressa nos hospedeiros através da pele ou membranas mucosas do sistema respiratório e trato digestivo.
- Uma pequena parcela das infecções: inicia no trato urogenital e conjuntiva.
- Outras infecções: necessitam que algo seja capaz de romper a pele, uma das mais poderosas barreiras contra infecções, para dar início ao processo infeccioso. Enquanto intacta, a pele é impermeável à maioria dos microorganismos. Uma vez rompida ou perfurada (p.ex. através de cortes, injeções ou picadas de insetos) estes agentes conseguem penetrar no hospedeiro e dar início à infecção (ex.: Hepatite B, a AIDS e a Febre Amarela).

Via de regra, os vírus penetram no organismo por uma das seguintes formas:

1- Inalação

Ocorre quando o agente é aspirado juntamente com o ar. Nesses casos, o vírus pode encontrar-se suspenso no ar, em gotículas aerossolisadas, ou na poeira suspensa por movimentos do ar. Exemplos: infecções virais respiratórias (rinovírus, adenovírus), hantavírus.

2- Ingestão

O **trato gastrointestinal** (TGI) fornece grande resistência a infecções. Poucos são os microorganismos capazes de resistir ao ambiente gastrointestinal: Enterovírus (vírus da poliomielite ou Paralisia Infantil, os vírus das Hepatites A e E) são transmitidos por ingestão, a partir de água ou objetos (fômites) contaminados.

- A parte superior do TGI, incluindo a boca e o faringe, são as partes mais expostas do sistema, mas as mucosas apresentam características especiais para combater infecções. Além dos epitélios de revestimento e das enzimas presentes na saliva (que podem inibir alguns vírus por sua ação proteolítica), há a **imunoglobulina A (IgA)** secretória, que atua sobre os vírus e pode inclusive neutralizá-los.
- Um grande número de infecções virais, em seus estágios iniciais de multiplicação, envolvem as amígdalas ou tonsilas. Estes órgãos linfóides, por sua localização anatômica, são freqüentemente utilizados como sítio primário de multiplicação de vírus. Exemplos: rubéola, cachumba, polio. Animais: peste suína clássica, diarreia viral bovina.
- O esôfago raramente é sítio primário de multiplicação dos vírus.
- **O estômago, com seu pH extremamente ácido, igualmente desfavorece a instalação de vírus. Na verdade, a passagem através deste órgão exige que os agentes infecciosos tenham acentuada resistência a pH ácido (Ex: rotavírus).**
- Após o pH estomacal, os vírus, a seguir, tem que submeter-se ao pH alcalino do intestino, à presença de fagócitos, enzimas proteolíticas inibidoras de vírus, à bile,

detergentes intestinais, e - além disso tudo - a uma nova bateria de anticorpos IgA secretórios. Caso todas essas barreiras sejam suplantadas, aqueles vírus que se multiplicam nas células intestinais - ou que utilizam estas células como sítio de multiplicação primária - poderão dar início a seu ciclo replicativo.

3- Inoculação

Várias são as formas de inoculação de agentes, muitas delas provocadas pelo próprio hospedeiro. Picadas de insetos configuram um importante método de penetração viral, pois durante a sua alimentação os vetores (mosquitos, pulgas, carrapatos) inoculam os vírus diretamente na corrente sanguínea do hospedeiro, processo esse denominado **transmissão mecânica**. É o caso das **arboviroses** (isto é, viroses transmitidas por artrópodos). Alguns vírus, além de serem mecanicamente transmitidos, podem desenvolver parte de seu ciclo replicativo no inseto (ex. febre amarela).

A **inoculação percutânea** (isto é, através da pele, como em injeções e transfusões) via injeções também é uma via extremamente eficaz de infecção. Incluem-se aqui os usuários de drogas injetáveis, bem como procedimentos médicos que requerem transfusões e quaisquer outros que possibilitem contato com sangue ou outros produtos infectados.

MULTIPLICAÇÃO E DISSEMINAÇÃO NO HOSPEDEIRO

Mecanismos de distribuição do vírus no organismo

- Em muitos casos, os vírus se multiplicam **diretamente na porta de entrada**. Ex: vírus que atacam epitélios (ex. Herpes Simples, Papilomavírus) e vírus que afetam o trato respiratório (ex. Influenza, Rinovírus e Adenovírus). Usualmente permanecem confinados exclusivamente a estas superfícies, com um mínimo de penetração nos tecidos.
- Além do contato célula-célula, estes vírus podem ser levados a outros sítios mais distantes no aparelho respiratório pelo próprio muco que irriga as mucosas. Nesses casos, o agente usualmente não se dissemina pelo corpo do indivíduo infectado.
- Outros vírus são capazes de estabelecer **uma infecção localizada e a partir daí se disseminar por todo o organismo** (ex. varíola), causando sinais clínicos em locais diferentes daquele usado como porta de entrada. Nesses casos (infecções sistêmicas) passam por um período de multiplicação inicial, localizada, para posteriormente distribuir-se pelo organismo infectado, como segue.

Infecções sistêmicas:

Uma vez vencida a barreira representada pelos epitélios (pele ou mucosas), o vírus é exposto às células de defesa do organismo.

Caso haja lesão tecidual, ocorre reação inflamatória. Os capilares se tornam mais permeáveis ou se rompem, com o extravasamento de citocinas, monócitos e linfócitos. **Células polimorfonucleares e macrófagos teciduais (células de Langerhans) tentarão destruir o vírus invasor**. Se o vírus for destruído, seus componentes serão processados por células da linhagem macrófágica (denominadas células apresentadoras de antígeno, ou APCs) e que levarão estes componentes virais para apresentá-los a outros componentes do sistema imune. Por outro lado, alguns vírus se multiplicam dentro dessas células e as utilizam para sua disseminação. **Assim, a célula contendo o vírus (ou seus antígenos processados) irá ao linfonodo que drena a região infectada**.

Tendo atingido o linfonodo, o vírus poderá, via circulação linfática, atingir a circulação sanguínea (o que se chama **viremia primária**) e espalhar-se por todo o organismo, seja dentro de

macrófagos e/ou monócitos (ex.: HIV, Mononucleose Infecciosa, Citomegalovirose, Diarréia Viral Bovina), seja circulando livremente no plasma (ex: Diarréia Viral Bovina; Hepatites B, C, e Delta, parvovírus), ou mesmo, embora mais raramente, adsorvidos a eritrócitos (como o vírus da Peste Suína Africana), ou plaquetas (vírus da Coriomeningite Linfocítica dos camundongos). Após esta viremia inicial, a qual freqüentemente passa despercebida, ocorre uma **viremia secundária**, onde um grande número de partículas virais é encontrado em circulação. Como consequência desse nível maior de viremia, os vírus distribuem-se nos órgãos-alvo do indivíduo em maior quantidade.

INFECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE INFECÇÕES VIRAIS

Infecção => superfícies do organismo (ou inoculação) => linfonodos=> viremia primária=> órgãos => viremia secundária=> órgãos "alvo".

(Modificado a partir de: Mims C.A. & White D.O.(1984) *Viral pathogenesis and Immunology*. Blackwell, 1984)

Infecções do sistema respiratório:

- A contaminação do trato respiratório se dá usualmente pela **inalação de gotículas de secreções de indivíduos contaminados** (por **aerossóis contendo gotículas que carregam vírions**), **hábitos sociais** (beijos, cumprimentos com as mãos).
- Mãos: podem levar à "auto-inoculação" por contato com olhos, narinas, ou abrasões.

Para combater essas infecções, as principais defesas do sistema respiratório são os macrófagos e um tapete de epitélio ciliado, recoberto por muco. Estes possuem a função de "varrer" a superfície de todo o epitélio respiratório, retirando corpos estranhos que se encontrem na superfície da mucosa respiratória.

Entretanto, mudanças no padrão normal de limpeza destes epitélios podem levar a um **desequilíbrio**, com consequente **aumento da suscetibilidade a infecções**. Tais mudanças podem ocorrer, por exemplo, por fatores ambientais (mudanças de temperatura, variações de umidade do ar), uso de agentes lesivos à mucosa (p.ex. **fumo, inalação de drogas**), ou alergias respiratórias. Caso o vírus esteja presente no epitélio, poderá ser desencadeada uma nova infecção.

Infecções do sistema nervoso:

Os vírus são capazes de causar infecções no sistema nervoso, o fazem ou via corrente sanguínea, por via linfática, ou ainda por via neuronal, trafegando no interior de neurônios. Um exemplo típico desse último caso é o vírus da raiva, que trafega via neurônios até atingir o sistema nervoso central.

Outro exemplo importante (e freqüente) são as infecções por herpesvírus, que podem estabelecer latência em gânglios nervosos.

APARELHO UROGENITAL

São poucos os vírus que afetam diretamente o próprio trato urogenital. Mesmo assim, este também apresenta seus mecanismos de defesa. A uretra é freqüentemente lavada com urina estéril, remoendo mecanicamente os potenciais invasores. Na vagina, populações de lactobacilos comensais acidificam o meio, dificultando assim o ataque por determinados vírus. Na verdade, como no estômago, poucos são os vírus capazes de resistir a pH tão ácido.

O próprio HIV, se não contasse com a proteção fornecida pelo efeito tamponador dos líquidos seminais, seria rapidamente inativado se exposto diretamente ao pH vaginal.

Outro exemplo, o Herpes Simples Humano tipos 1 e 2 e os Papilomavírus. Igualmente, os Poliomavírus (BK e JC), os quais são normalmente transmitidos via trato respiratório; subsequentemente instalam-se nos túbulos renais e ureteres e estabelecem uma infecção latente, onde apesar da presença do genoma viral, não ocorre a produção de vírus infeccioso. Em algumas situações (gestação, imunodeficiências, administração de drogas imunossupressoras) estes vírus podem ser reativados e disseminados em grandes quantidades pela urina.

Outro exemplo é o **citomegalovírus** (um betaherpesvírus), o qual também estabelece uma infecção latente, porém em células linfóides. Por ocasião da gestação, o vírus é eliminado na urina em cerca de 10-15% das gestantes normais, bem como em grande quantidade na urina de crianças infectadas congenitamente.

CONJUNTIVA

A conjuntiva é protegida pelas secreções das glândulas lacrimais e constantemente “lavada” por essas secreções, através do movimento das pálpebras. Através dessas secreções e do movimento palpebral, os microorganismos são removidos via ductos lacrimais, indo ter à cavidade nasal ou trato digestivo. Não obstante, alguns vírus são capazes de causar infecção via conjuntiva, uma vez que receptores presentes na mucosa conjuntival são capazes de permitir sua adsorção e subsequente multiplicação. Esse é o caso dos rinovírus, principais agentes causadores de resfriados, bem como dos adenovírus. Estes últimos podem inclusive causar infecções oculares que podem assumir proporções epidêmicas, como é o caso da conjuntivite hemorrágica, enfermidade que ocasionalmente se manifesta na forma de epidemias, em nosso meio.

Muito comumente, as pessoas se auto-inoculam com microorganismos através do contato direto das mãos com a conjuntiva ocular. Se a pessoa houver tocado as mãos de alguém contaminado, a transmissão pode se efetivar novamente...

A seguir, é apresentada uma tabela com as características mais marcantes das infecções localizadas, em comparação com as infecções generalizadas (ou sistêmicas).

Tabela. COMPARAÇÃO ENTRE DOENÇAS VIRAIS AGUDAS LOCALIZADAS OU SISTÊMICAS.(*)

	Infecções localizadas	Infecções sistêmicas
Local da patologia	Porta de entrada	Distante da porta de entrada
Período de incubação	Curto	Mais longo
Viremia	Ausente	Presente
Imunidade	Variável	Usualmente longa
Papel da IgA secretória	Importante	Usualmente pouco importante

(*) Modificado a partir de Brooks GF, Butel JS & Ornston LN: *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, Lange, 1995.

Diagnóstico laboratorial de infecções víricas

In: A Concise Review of Veterinary Virology, Carter G.R., Wise D.J. and Flores E.F. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 3-Mar-2005; A3407.0305.PT

D.J. Wise¹, G.R. Carter² and E. F. Flores³

¹Department of Biology, Concord University, Athens, West Virginia, USA.

²Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech, Blacksburg, Virginia, USA.

³Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil.

Traduzido por: [E. F. Flores](#), Department of Veterinary Preventive Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS Brazil. (14-Dec-2005).

Índice

- Métodos diagnósticos
- Isolamento viral
- Neutralização viral
- Testes de proteção
- Coleta e remessa de amostras
- Glossário

Métodos diagnósticos

Os métodos básicos de diagnóstico virológico são o isolamento viral, detecção de vírus ou de produtos virais em amostras clínicas (métodos diretos); e detecção e quantificação de anticorpos anti-virais específicos (métodos indiretos). Cada método possui seus méritos, mas a demonstração direta do vírus e/ou de produtos virais é o método mais efetivo e útil para diagnóstico de rotina.

Métodos de demonstração (diretos)

Os métodos diretos incluem a visualização dos vírions por microscopia eletrônica, detecção do genoma viral através de sondas de DNA e detecção de antígenos virais por imunofluorescência. Esse último método tem sido o mais útil em laboratórios de diagnóstico.

Métodos sorológicos gerais

Nos estágios tardios da infecção, a pesquisa de anticorpos específicos no soro pode ser o único método possível de diagnóstico. Isso pode ser feito por várias técnicas sorológicas.

As técnicas mais utilizadas em laboratórios de diagnóstico são a soro-neutralização (SN), inibição da hemaglutinação (HI), imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e testes imunoenzimáticos (ELISAs). Esses métodos baseiam-se no fato de que a atividade viral pode ser inibida e/ou proteínas virais são ligadas por anticorpos específicos. Diluições do soro são testadas e os resultados são expressos como a recíproca da maior diluição do soro na qual a atividade antiviral pode ser detectada. De maneira ideal, resultados do teste de amostras coletadas na fase convalescente devem ser comparados com resultados de amostras coletadas na fase aguda da infecção (duas coletas, 14 a 21 dias de intervalo). O diagnóstico é positivo se ocorrer um aumento igual ou superior a quatro vezes nos títulos de anticorpos entre as amostras pareadas.

Os resultados de uma única coleta (não-pareada) e teste são mais difíceis de ser interpretados. Para os vírus que produzem infecções agudas auto-limitantes, testes positivos indicam apenas uma exposição prévia ao agente, devido à infecção natural ou vacinação. A interpretação pode ser facilitada pelo teste de um grupo de animais que estiveram doentes comparando-se com um grupo que não apresentou a doença, pois títulos mais altos geralmente são indicativos de refletem infecção recente. Para os vírus que produzem infecções persistentes ou latentes (exemplos: herpesvírus e retrovírus), sorologia positiva indica que o animal é um portador potencial do agente.

Resultados positivos de testes obrigatórios oficiais são sempre significativos independentemente do título de anticorpos. Por essa razão, outros testes de padronização mais fácil, na forma de kits, foram desenvolvidos. Exemplos são o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), também conhecido como teste de Coggins, para anemia infecciosa equina e ELISA e aglutinação em látex (LA) para doença de Aujeszky.

Os resultados desses testes são considerados simplesmente positivos ou negativos. Uma discussão sobre as diferentes técnicas diagnósticas é apresentada a seguir nesse capítulo.

Isolamento viral

Uso: isolamento e identificação de vírus.

A fase aguda da doença é a melhor fase para se demonstrar e se isolar o vírus. Com a progressão da doença ocorre a produção de anticorpos, o que reduz a excreção viral e reduz ou elimina o vírus dos tecidos. As manifestações clínicas da doença geralmente direcionam a escolha do material clínico apropriado para o diagnóstico, como secreções nasais e oculares no caso de infecções do trato respiratório superior; fezes em infecções entéricas, sangue em infecções sistêmicas, etc.

Os vírus requerem células vivas para replicar. No laboratório, células vivas são utilizadas em forma de cultivos celulares, cujas células são obtidas por digestão enzimática de tecidos animais. As células são cultivadas em superfície/frascos de vidro ou plástico.

Quando amostras clínicas contendo vírus são inoculadas em células susceptíveis, o vírus (se viável) replica e produz patologias celulares que se caracterizam por alterações morfológicas nas células, denominadas genericamente de efeito citopático (ecp). Em alguns casos, o vírus replica sem induzir patologia celular e a demonstração de sua presença requer o uso de técnicas de detecção de antígenos ou corpúsculos de inclusão por imunofluorescência (IF). O tempo necessário para se isolar um vírus varia entre menos de 24 horas até várias semanas.

Imunofluorescência (IF)

Uso: detecção de antígenos virais em amostras clínicas ou em células de cultivo infectadas.

O teste de imunofluorescência (IF) detecta antígenos virais em células infectadas utilizando anticorpos anti-virais específicos marcados com uma substância fluorescente (isotiocianato de fluoresceína, FITC). Testes de IF podem ser realizados em cortes congelados de tecidos, esfregaços sanguíneos, impressões de tecido ou em células de cultivo. Os resultados podem ser obtidos em menos de 1 hora – e são confiáveis desde que o anticorpo utilizado seja específico e as amostras estejam em boas condições.

Existem dois tipos principais de imunofluorescência: direta (IFD) e indireta (IFI). No método direto, o anticorpo anti-vírus é marcado. O anticorpo marcado é usado para detectar antígenos virais em cortes de congelamento, esfregaços sanguíneos, raspados, etc...

A técnica indireta (IFI) é realizada em duas etapas. A amostra a ser testada é inicialmente incubada com um anticorpo anti-viral não-marcado. Após um determinado período de incubação para que ocorra a ligação anticorpo-antígeno (geralmente 1 hora ou menos), a preparação é lavada e então incubada com um anticorpo anti-espécie do anticorpo primário, marcado com FITC. O anticorpo anti-espécie irá se ligar ao anticorpo anti-viral não-marcado, e se isso ocorre, emitirá luz fluorescente considerando-se o resultado como positivo.

Ambas as técnicas (IFD e IFI) possuem vantagens e desvantagens. A IFD é mais rápida e mais utilizada principalmente pela disponibilidade de conjugados. A técnica indireta (IFI), por outro lado, é mais sensível e mais específica (se anticorpos monoclonais são utilizados); é mais demorada mas requer apenas um tipo de anticorpo marcado com FITC se todos os anticorpos anti-virais foram preparados na mesma espécie.

A IF é a técnica mais utilizada no diagnóstico virológico de rotina. Um grande número de conjugados está disponível comercialmente para a detecção de uma grande variedade de vírus. Conjugados para a detecção de vírus de caninos e felinos são disponíveis no comércio.

Uma variação da técnica pode ser utilizada para a detecção e quantificação de anticorpos. Essa técnica envolve a infecção de cultivos celulares com um vírus e a preparação de lâminas de microscopia multipost com essas células infectadas. O soro pode ser testado para a presença de anticorpos específicos incubando-se com as células infectadas, seguido da adição de um anticorpo contra IgG da espécie do soro-teste, conjugado com FITC. A emissão de fluorescência pelos spots de cultivos indica que a amostra é positiva para anticorpos anti-virais específicos.

Imunoperoxidase

Uso: detecção de antígenos virais em amostras clínicas ou em células de cultivo.

O princípio da técnica de imunoperoxidase é muito semelhante ao da imunofluorescência. A diferença é que o anticorpo é conjugado com uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina) ao invés de fluoresceína. Embora a enzima esteja conjugada ao anticorpo, ela permanece ativa e, quando entra em contato com um substrato, age sobre este, resultando em mudança de cor. Essa técnica possui a vantagem sobre a IF

de não necessitar microscópio de fluorescência e é especialmente útil para a detecção de antígenos virais em lesões histopatológicas.

Ensaio imunoenzimático (ELISAs)

Uso: detecção de antígenos ou anticorpos.

A sensibilidade dos testes de ELISA é equivalente à do **radioensaio** (RIA), que é similar em princípio. Um sistema de fase sólida é utilizado na maioria dos testes de ELISA. Para a detecção de vírus, os anticorpos específicos são inicialmente imobilizados na superfície de tubos ou placas de poliestireno e a amostra-teste contendo o vírus suspeito é então adicionada. Se o vírus está presente, irá se ligar nos anticorpos adsorvidos. Após lavagem, anticorpos anti-virais específicos conjugados com uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina) são adicionados. Os anticorpos conjugados reagem com o complexo anticorpo-antígeno originando um efeito "sanduíche". Após nova lavagem, o substrato da enzima é adicionado, resultando na produção de coloração. Alguns testes podem ser visualizados e interpretados visualmente, mas a análise por espectrofotômetro aumenta a sensibilidade.

Um teste ELISA indireto é utilizado para a detecção de anticorpos. O antígeno é inicialmente imobilizado no suporte sólido, seguido da adição do soro-teste. Após lavagem, um anticorpo anti-imunoglobulina conjugado com a enzima é adicionado, seguido de adição do substrato da enzima. Variações do teste ELISA incluem o ELISA competitivo para a detecção de anticorpos, no qual o anticorpo anti-imunoglobulina conjugado com a enzima é substituído por um anticorpo anti-viral conjugado com a enzima. A intensidade da coloração desenvolvida pelo substrato é inversamente proporcional ao nível de anticorpos presentes na amostra-teste.

Em outras palavras, se o anticorpo específico se ligou, o anticorpo conjugado com a enzima não irá se ligar. Portanto, resultados positivos são aqueles em que não ocorre desenvolvimento de coloração no substrato ou a coloração é menos intensa do que nos controles negativos.

Outra variação é o ELISA de cinética, utilizado para a detecção de anticorpos contra o agente da doença de Lyme em cães, vírus da leucemia felina, peritonite infecciosa felina, toxoplasmose felina e herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). No ELISA de cinética, a reação é monitorada continuamente durante um certo período, ao invés de ser interrompida após um certo tempo de incubação. Testes imunoenzimáticos do tipo ELISA e aglutinação em látex (LA) detectam antígenos virais capturando-os através de anticorpos específicos adsorvidos em suportes apropriados.

Essas técnicas permitem um diagnóstico rápido e são freqüentemente disponíveis para uso em consultórios e clínicas. Kits comerciais incluem ELISAs e kits LA para a detecção de rotavírus em fezes de várias espécies animais, e kits de ELISAs rápidos para a detecção de parvovírus canino em fezes e antígenos do vírus da leucemia felina no sangue.

Agglutinação em látex (LA)

Uso: detecção de antígenos ou anticorpos.

Os testes de LA possuem um princípio semelhante à aglutinação bacteriana na qual partículas de látex recobertas com anticorpos aglutinam-se quando misturadas com o antígeno correspondente, identificando-o.

Alternativamente, as partículas de látex podem ser recobertas com antígenos para a detecção de anticorpos. Esses testes são de fácil execução e permitem a obtenção dos resultados em minutos. Kits comerciais para uso em clínicas são disponíveis para a detecção de anticorpos para algumas doenças e também para a detecção de alguns vírus.

Microscopia eletrônica (ME)

Uso: demonstração de vírus em amostras clínicas.

Na técnica de ME sob coloração negativa, preparações solubilizadas em água destilada de amostras clínicas são "coradas" com uma solução de átomos pesados. Essa técnica é primariamente utilizada para o exame de amostras clínicas suspeitas de conter um grande número de partículas virais, como fezes (coronavírus, rotavírus e parvovírus), lesões vesiculares e de lesões de "pox" (herpesvírus e poxvírus). A preparação e o exame da amostra por ME podem ser completados em menos de 30 minutos.

Imunoeletromicroscopia

Uso: detectar e identificar vírus.

A técnica de ME mencionada acima para demonstração de vírus pode também ser utilizada para se identificar vírus. O vírus é incubado com soro hiperimune específico, resultando em aglutinação das partículas que pode ser visualizada ao microscópio eletrônico.

Soro-neutralização (SN)

Uso: detectar e quantificar anticorpos.

A SN é técnica mais utilizada para a detecção e quantificação de anticorpos contra vírus de interesse veterinário. O teste é considerado o mais confiável de todos os testes sorológicos, sendo menos sujeito à variação e de interpretação mais objetiva.

O teste baseia-se na capacidade de anticorpos específicos neutralizarem o vírus correspondente e assim prevenir a sua replicação e a conseqüente produção de citopatologia em cultivo celular; ou sinais clínicos, lesões e mortalidade em ovos embrionados ou animais.

Os testes de SN são quase exclusivamente realizados utilizando cultivos celulares. O vírus em questão é previamente cultivado, quantificado e estocado em alíquotas à ultra-baixa temperatura. Esse vírus deve ser quantificado (titulado) várias vezes para que se determine exatamente a quantidade de vírus presente. Diluições do soro-teste são colocadas em placas de microtitulação, seguido da adição de uma quantidade fixa da suspensão viral aproximadamente 100 a 300 doses infecciosas por cavidade. Após a incubação do vírus com as diferentes diluições do soro-teste, geralmente 1 - 2 horas a temperatura ambiente (alguns sistemas utilizam 37°C ou 4°C), as células indicadoras são adicionadas. As placas são então incubadas a 37°C e observadas diariamente para o aparecimento de efeito citopático (ecp). A presença de anticorpos específicos no soro-teste impede a produção de ecp pelo vírus. Os testes de SN são também utilizados para se identificar isolados de vírus desconhecidos, essencialmente da mesma forma descrita acima. A única diferença é a que a especificidade dos anticorpos é conhecida e o vírus é desconhecido. Se um determinado anticorpo inibe a produção de ecp pelo agente desconhecido, então a identificação do vírus está feita.

Inibição da hemaglutinação (HI)

Uso: detecção e quantificação de anticorpos.

O princípio do teste de inibição da hemaglutinação (HI) é semelhante ao da SN, com a diferença que a atividade viral inibida pelo soro-teste é a capacidade hemaglutinante. Os testes de HI são muito sensíveis e altamente específicos, e são particularmente úteis para quantificar anticorpos contra vírus hemaglutinantes que não replicam bem em cultivo celular ou produzem ecp discreto ou dificilmente reconhecível. Exemplos são os vírus da Influenza tipo A de várias espécies animais, vírus da Doença de Newcastle e parvovírus suíno.

Os testes de HI são realizados em placas de microtitulação. Diluições do soro-teste são realizadas, seguidas da adição de um volume igual de uma suspensão contendo aproximadamente 4 a 8 unidades hemaglutinantes do vírus (uma unidade hemaglutinante é a maior diluição da suspensão viral capaz de produzir hemaglutinação completa). A suspensão apropriada de eritrócitos é então adicionada e as placas são incubadas durante 1 a 2 h a 4°C (para a maioria dos vírus). Se o anticorpo específico estiver presente no soro-teste, a aglutinação dos eritrócitos vai ser inibida e essas células irão rolar e sedimentar, formando um botão. Células que se aglutinam, ao contrário, irão formar uma camada fina sobre o fundo da cavidade, ou em formando botão de bordas irregulares. O soro-teste frequentemente contém inibidores inespecíficos da hemaglutinação; e deve ser adsorvido com eritrócitos antes do teste.

Fixação de complemento (FC)

Uso: detecção e quantificação de anticorpos.

Os testes de FC são especialmente úteis como métodos auxiliares no diagnóstico de infecções agudas ou recentes, pois detectam principalmente IgM, a primeira classe de imunoglobulinas a ser produzida em resposta à infecção.

O teste envolve o uso de antígeno viral, complemento obtido de cobaias e um sistema indicador de eritrócitos sensibilizados de ovinos. A sensibilização dos eritrócitos é realizada pela sua incubação com anticorpos específicos, chamados de hemolisina, produzidos em coelhos. O antígeno e o complemento são titulados e diluídos. Se o soro-teste não contém anticorpos específicos para o agente, o complemento fica livre para reagir com os eritrócitos sensibilizados, produzindo lise. A presença de anticorpos em quantidade suficiente produz a formação de complexos antígeno-anticorpo, que seqüestram o complemento, não permitindo que este produza lise dos eritrócitos.

Imunodifusão

Uso: detecção de anticorpos específicos ou antígenos.

As duas técnicas mais usadas de imunodifusão são o sistema de difusão dupla e a imunoelectroforese. Os dois testes são realizados em meios semi-sólidos, geralmente ágar ou agarose. A diferença principal entre os dois testes é que na imunoelectroforese o antígeno é previamente separado por electroforese, e então recoberto com um gel contendo o anticorpo.

Nos dois testes, o antígeno e os anticorpos se difundem no gel de ágar, formando uma linha de precipitação no local onde se encontram e reagem.

A imunodifusão dupla é um dos testes sorológicos mais utilizados em diagnóstico. O melhor exemplo é o teste de Coggins para a anemia infecciosa equina.

O teste de imunodifusão pode ser tornado mais sensível utilizando-se um marcador radioativo, possibilitando a detecção de complexos antígeno-anticorpo que não são visíveis a olho nu. O isótopo iodo (I^{125}) é o marcador mais utilizado, tanto para marcar o antígeno como os anticorpos. A marcação ocorre pela incorporação do I^{125} no amino-ácido tirosina.

Os resultados são obtidos pela exposição do gel ou lâminas a um filme de raios X que captura as linhas radioativas (precipitação).

Testes de proteção

Uso: identificação de vírus.

Os testes de proteção são utilizados para a identificação de vírus quando outros métodos mais simples não são disponíveis. Eles envolvem a indução de imunidade ativa ou passiva em animais seguido de desafio com o agente em questão.

Um exemplo foi o teste de proteção utilizado para a identificação do vírus da peste suína clássica. O teste foi realizado inoculando-se soro hiperimune específico simultaneamente com sangue ou suspensão de baço de um animal suspeito de estar infectado. Se o agente fosse o vírus da peste suína clássica, a imunidade passiva produzida pelo anti-soro anti-vírus da peste suína clássica protegeria o suíno do desafio. Os animais desprotegidos contrairiam a doença.

Hibridização de ácidos nucleicos

Uso: detecção de ácidos nucleicos DNA ou RNA virais em amostras clínicas.

A hibridização de ácidos nucleicos consiste das seguintes etapas:

- O ácido nucleico de cadeia dupla de um vírus é desnaturado com substância alcalina para a separação das cadeias.
- As cadeias simples do ácido nucleico são imobilizadas em um suporte sólido, geralmente uma membrana de nylon ou nitrocelulose, para impedir que as cadeias de se reassociem. O ácido nucleico se liga na membrana através da cadeia lateral de fosfatos; as bases nitrogenadas projetam-se externamente.
- Uma sonda (DNA de fita dupla ou RNA; de origem conhecida – contendo a sequência de nucleotídeos específica àquela do vírus alvo – conjugada com um isótopo radioativo ou enzima) é incubada com a membrana.
- Ocorre a formação de pontes de hidrogênio entre as bases complementares. As sondas que não se ligaram são removidas por lavagem e a hibridização é detectada através de um método de detecção da sonda.

Vários tipos de hibridização em suporte sólido são utilizados:

Hibridização Southern: Técnica utilizada para a detecção de um fragmento de DNA específico.

Hibridização Northern: Utilizada para detectar-se sequências específicas de RNA.

Hibridização Dot blot: Procedimento similar ao Southern e Northern, pode ser utilizado tanto para DNA como para RNA. A diferença é que o ácido nucleico-alvo é imobilizado em focos (pontos) na membrana, similar aos de uma placa de microtitulação.

Hibridização in situ: O princípio é semelhante ao Southern e Northern hibridização (detecção de um sequências de nucleotídeos específicas através de sondas marcadas), com a diferença que, ao invés do material suspeito ser extraído e imobilizado em membranas de nitrocelulose, a detecção é realizada diretamente em cortes histológicos do tecido ou células. Essa técnica tem uso limitado em diagnóstico mas é muito útil em pesquisa e estudos de patogenia.

As técnicas de análise de restrição enzimática, reação da polimerase em cadeia e microarranjo são particularmente úteis e são discutidas a seguir.

Análise de restrição enzimática (REA)

Uso: identificação de vírus específicos.

A análise de restrição enzimática (REA) utiliza enzimas chamadas endonucleases de restrição para traçar o perfil da seqüência do genoma dos vírus. A presença de mutações e/ou variabilidade genética em determinados pontos de clivagem no genoma de alguns isolados do vírus resulta em diferentes padrões de clivagem, quando são separados em gel de agarose. Essa análise é chamada de análise de polimorfismo de tamanhos de fragmentos (RFLP) e tem sido utilizada para caracterizar e comparar entre isolados de campo de um determinado vírus.

A técnica requer grande quantidade de DNA total ou parcialmente purificado, um grupo de enzimas para clivar o DNA, a capacidade de separar os fragmentos de DNA resultantes por eletroforese e um método de documentar os resultados.

A restrição enzimática de vírus com genomas grandes como o citomegalovírus, pode resultar em 20 a 50 fragmentos de DNA, enquanto vírus com genomas pequenos, como os adenovírus, geralmente produzem 5 a 10 bandas de DNA. Não é fácil, nem é sempre necessário, correlacionar o padrão de clivagem (mais ou menos bandas) com mutações em sítios específicos do genoma, sem a realização de estudos extensivos de hibridização ou mesmo o seqüenciamento dos genomas comparados.

Uma limitação importante do método é a de que a presença da mutação não será detectada se ocorrer exatamente em um dos locais reconhecidos e clivados pelas enzimas utilizadas. O uso de várias enzimas simultaneamente aumenta a probabilidade de detectar-se mutações em um determinado genoma ou parte do genoma.

Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Uso: detecção/identificação de vírus específicos ou genes específicos.

A reação da polimerase em cadeia (PCR), método *in vitro* de replicação de DNA, é capaz de amplificar (multiplicar) segmentos de DNA mais de um milhão de vezes. Uma cópia única do genoma viral – se presente na amostra clínica – é amplificada, produzindo milhões de cópias que então podem ser facilmente detectadas por eletroforese. Isso é obtido através da criação de uma reação que, além da amostra de DNA (que potencialmente contém o DNA-alvo do vírus), contém dois oligonucleotídeos (primers) com seqüências complementares as extremidades opostas de cada uma das cadeias da seqüência alvo, deoxinucleotídeos trifosfato e uma enzima DNA polimerase termoestável (Taq polimerase).

A mistura é então submetida a uma série de ciclos de temperatura para permitir e facilitar a replicação do DNA e conseqüentemente multiplicar o DNA. A seguir é descrito um ciclo típico:

- A primeira etapa de um ciclo do PCR é a desnaturação do DNA da amostra, pelo aquecimento da reação a 95°C.
- Segundo, a reação é resfriada para permitir a hibridização dos primers na seqüência-alvo de DNA.
- Terceiro, a reação é então aquecida a 72°C para permitir a polimerização do DNA a partir dos primers pela Taq DNA polimerase. Esse ciclo de temperaturas é repetido 35 a 40 vezes. Mais de um milhão de cópias do DNA podem ser obtidas dessa maneira.

Quando o número de ciclos planejado é concluído, o DNA alvo resultante é separado por eletroforese em gel e analisado através da visualização das bandas de DNA ou através de hibridização Southern com sondas específicas.

Vários testes diagnósticos baseados em PCR são comercialmente disponíveis.

A PCR pode ser utilizada também para o estudo de vírus RNA pelo uso da enzima transcriptase reversa que produz cópias cDNA a partir de RNA. Essa técnica é chamada de transcriptase reversa, RT-PCR. Outras variações da PCR incluem a PCR em tempo real, na qual a análise espectrofotométrica dos produtos é realizada simultaneamente à reação; e a PCR aninhada (nested-PCR) que utiliza dois conjuntos de primers, sendo um conjunto específico para uma região interna à amplificada pelo primeiro conjunto. Cada uma dessas variações são úteis quando a quantidade de ácido nucléico é muito pequena. A eficácia da PCR em tempo real para diagnóstico em amostras clínicas ainda não foi estabelecida.

Radioimunoensaio

Uso: detecção de antígeno ou anticorpos.

Atualmente, o radioimunoensaio é raramente utilizado em laboratórios de diagnóstico virológico. Existem dois tipos de RIA: em fase líquida e em fase sólida. No sistema em fase líquida, os complexos antígeno-anticorpo são precipitados pela adição de anti-imunoglobulinas. O precipitado é coletado por centrifugação e seco. A quantidade de radioatividade no precipitado, comparada com a radioatividade total, é a quantificação da reação antígeno-anticorpo. A marcação é realizada com I^{125} (veja imunodifusão), em qualquer um dos três componentes da reação.

No sistema de fase sólida, o anticorpo é imobilizado na superfície interna de um tubo de poliestireno e então adicionado do antígeno. Resumidamente, o material clínico é adicionado ao tubo previamente recoberto internamente com o anticorpo específico. Se o antígeno está presente, liga-se ao anticorpo adsorvido. Após lavagem, um anticorpo anti-viral marcado com I^{125} é adicionado, reagindo com o complexo imobilizado num efeito "sanduíche". O tubo é lavado e a quantidade de radioatividade é determinada.

Embora as técnicas de detecção de antígeno descritas acima são utilizadas com primeiro teste diagnóstico, muitas vezes essas técnicas não são aplicáveis pois amostras clínicas apropriadas não puderam ser obtidas de animais vivos. Da mesma forma, técnicas rápidas de detecção de antígeno não são disponíveis para vários vírus. Nesses casos, recorre-se ao isolamento viral.

Microarranjo (microarray)

Uso: identificação de vírus específicos ou seqüências virais específicas.

O desenvolvimento dos "microarranjos" foi impulsionado pela aplicação da tecnologia de robótica na rotina da biologia molecular, mais do que por qualquer avanço tecnológico. As técnicas de Southern e Northern blot para a detecção de DNA e RNA mensageiro serviram de base tecnológica para a hibridização em microarranjo.

A construção dos microarranjos envolve a deposição de seqüências específicas de DNA em pontos na superfície de uma lâmina de vidro ou chip de sílica através de robótica. Um único chip pode conter até 50.000 genes. Os chips (ou lâminas) são então expostos a uma fonte de DNA marcado com substância fluorescente. Um computador monitora a fluorescência nos diferentes pontos da superfície do chip, indicando onde o DNA marcado se ligou no DNA imobilizado na lâmina/chip.

Como milhares de seqüências de DNA podem estar presentes no chip, é possível através deste teste analisar vários patógenos simultaneamente. Isso é particularmente importante para a detecção de microrganismos usados como armas biológicas e diagnóstico de doenças. Vários microarranjos são comercialmente disponíveis, como o CapitalBio_SARSarrayTM-1.8 Sistema de Detecção para identificar estágios precoces de infecção pelo vírus da SARS. Além dos microarranjos de ácidos nucleicos, microarranjos de proteínas também têm sido utilizados. Nesses casos, procura-se proteínas específicas.

Coleta e remessa amostras

O diagnóstico laboratorial de uma doença clínica depende em grande parte do tipo e condição do material submetido. Depende também da ação coordenada do veterinário de campo e do técnico laboratorial. Devido ao fato da maioria dos testes laboratoriais serem específicos para um determinado agente, um histórico clínico adequado deve acompanhar todos os materiais submetidos. Isso permite ao pessoal do laboratório realizar testes adicionais, se necessário e indicado.

Regras gerais de coleta e remessa de material são apresentadas a seguir. A maioria dos laboratórios fornece um formulário de remessa de amostras que deve ser preenchido com as informações pertinentes. Na ausência desse formulário, o veterinário deve fornecer um histórico o mais completo possível. Devem, entrar em contato com o laboratório para esclarecer quaisquer dúvidas.

Animais

Animais vivos, doentes, devem ser preferidos aos de animais mortos. Sempre que possível, esses animais devem ser enviados ao laboratório para um exame e necropsia completos. Se o problema afeta um rebanho, mais de um animal deve ser enviado. Ônibus e transportadoras podem ser utilizados para transportar animais de pequeno porte, desde que acondicionados apropriadamente em caixas ou embalagens apropriados à prova de vazamentos. Não congele animais a serem submetidos para a necropsia.

Tecidos

Para evitar contaminação durante a necropsia, recomenda-se coletar uma série de tecidos antes de realizar-se um exame minucioso. Órgãos/tecidos recomendados para se coletar são: pulmão, rins, fígado, baço, intestino delgado e grosso, linfonodos regionais. O cérebro ou a cabeça devem ser coletados em suspeita de doença do sistema nervoso central. Outros tecidos que contenham lesões observadas durante o exame também devem ser coletados. Uma porção de cada tecido deve ser acondicionada em sacos plásticos impermeáveis e refrigerados. Cada tecido/órgão deve ser preferencialmente acondicionado em um saco individual. Segmentos de intestino devem ser obrigatoriamente acondicionados em separado, para se evitar contaminação bacteriana, pois sêmen e xame bacteriológico será comprometido.

Tecidos coletados próximo ao final de semana devem ser enviados na próxima segunda-feira.

Devido ao fato de que muitos vírus produzem lesões características microscópicas pequenos fragmentos (0.5 cm de espessura) de cada tecido devem ser acondicionados em frascos com formol tamponado a 10% para exames histológicos. Em casos de doença neurológica, recomenda-se enviar uma metade longitudinal do cérebro. Essas amostras não devem ser congeladas.

Fezes

Fezes devem ser coletadas de animais doentes e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados. Embora swabs saturados em fezes sejam adequados para alguns exames virológicos individuais, algumas gramas de fezes permite um espectro maior de exames, incluindo bacteriológico e parasitológico. AS amostras devem ser submetidas ao laboratório utilizando gelo reciclável.

Swabs

Swabs nasais e oculares são úteis para o isolamento de vírus de animais com doença do trato respiratório superior. Infecções genitais também podem ser diagnosticadas pelo exame de swabs coletados do trato reprodutivo (vulva, vagina, pênis, prepúcio). Os swabs devem ser coletados de animais com a infecção aguda e acondicionados diretamente em tubos contendo um meio de transporte para vírus. A coleta de material de vários animais, em diferentes estágios da infecção, aumenta a probabilidade de isolamento do agente. Swabs são úteis também para coletar-se amostras de lesões vesiculares.

Vesículas frescas devem ser rompidas e os swabs embebidos com o conteúdo. Dois swabs devem ser sempre coletados, um para microscopia eletrônica e outro para o isolamento de vírus. O swab para isolamento deve ser acondicionado em meio de transporte e o swab para microscopia eletrônica deve ser colocado em um tubo contendo um pequeno volume (uma a duas gotas) de água destilada. Material descamativo de lesões mais avançadas também deve ser submetido.

Existem vários meios comercialmente disponíveis que auxiliam a manter a viabilidade dos vírus durante o transporte ao laboratório.

A maioria desses meios contém solução iônica balanceada, proteínas e antibióticos para impedir proliferação bacteriana. Vários laboratórios fornecem seus próprios meios de transporte quando requisitados por veterinários de campo.

Lâminas

Várias doenças infecciosas podem ser diagnosticadas pelo exame de lâminas preparadas a partir de sangue ou tecidos. Esfregaços sanguíneos são utilizados para o diagnóstico da leucemia felina, enquanto esfregaços sanguíneos e raspados conjuntivais são usados no diagnóstico da cinomose. Raspados conjuntivais são particularmente úteis no diagnóstico de infecções por herpesvírus e clamídias em gatos. Impressões do fígado, baço e pulmões são especialmente úteis no diagnóstico de infecções por clamídias e herpesvírus em psitacídeos.

As lâminas devem conter um número suficiente de células para permitir um exame detalhado, mas não devem se muito espessas a ponto de dificultar a coloração. Um raspador conjuntival ou outro aparelho (borda cega de uma lâmina de bisturi) podem ser usados para raspar a conjuntiva; swabs de algodão não são adequados. Sacos conjuntivais purulentos ou com secreção contaminada devem ser lavados antes da coleta do raspado. Impressões de tecido devem ser feitas através de pressão leve do tecido (previamente adsorvido em papel-toalha para remover o sangue) contra a superfície da lâmina.

As lâminas devem ser secas ao ar e remetidas ao laboratório em suportes especiais para prevenir a sua quebra. O envio de várias lâminas permite um exame mais detalhado, incluindo citológico.

Soro

Amostras de sangue devem ser coletadas em tubos estéreis sem anticoagulante. Estes devem ser enviados ao laboratório em caixas de isopor com gelo, em estantes para impedir que se rompam. Amostras de sangue não devem ser congeladas ou aquecidas em excesso. Se as amostras não puderem ser enviadas ao laboratório em poucas horas, o soro deve ser separado e refrigerado ou congelado.

Glossário

Aliquotar: Dividir (como uma solução) em partes iguais.

Primers: pequenas seqüências de DNA ou RNA utilizados como iniciadores para a síntese de ácido nucléico. O primer hibridiza com a sua região complementar na molécula molde do ácido nucléico e fornece a oxidrila 3' para o início da síntese. Os primers delimitam a região que vai ser amplificada. Na PCR, dois primers (as vezes mais) oligonucleotídeos sintéticos (em torno de 20 nucleotídeos) são complementares a regiões nas cadeias opostas flanqueiam a região alvo; as extremidades oxidrila 3' são orientadas uma na direção da outra. Na PCR, a seqüência alvo em uma amostra é geralmente de 100 a 2000 pares de bases de extensão. Primers desenhados e arbitrários podem ser usados.

Testes regulatórios: são testes realizados por imposição de legislação oficial de órgãos governamentais para doenças animais de interesse sanitário estratégico.

Endonuclease de restrição: são enzimas derivadas de bactérias, que reconhecem e cortam o DNA em sequencias específicas.

Polimorfismo de tamanhos de fragmentos (RFLP): revelam muitas diferenças no DNA entre indivíduos de uma mesma espécie. RFLPs resultam da clivagem do DNA por enzimas de endonucleases de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese e visualização das bandas (fragmentos de DNA) pela coloração com brometo de etídio.

Taq polimerase: DNA polimerase utilizada na PCR. É derivada de uma bactéria aquática denominado *Thermus aquaticus* que vive em águas de gêisers; a termoestabilidade da enzima permite seu uso na PCR.

Direitos reservados: este documento está disponível em www.ivis.org. Documento núm. A3407.0305.PT

CLASSIFICAÇÃO DOS VÍRUS

Objetivos:

Ao final desta aula o aluno será capaz de reconhecer os fundamentos da taxonomia viral e reconhecer alguns membros importantes das principais famílias de vírus.

A BASE DA CLASSIFICAÇÃO

- Estrutura (genoma, morfologia, presença de envelope);
- Estratégia de replicação;
- Parentesco antigênico (sorologia; divisão em sorotipos);
- Seqüência de nucleotídeos (genotipos)

TAXONOMIA

Ordem: duas ordens:

Mononegavirales e *Nidovirales*

Família: designação termina com: ...*viridae*

Sub-família: ...*virinae*

Genero: ...*virus*

Exemplo: o vírus Herpes Simples Humano pertence à:

Família: *Herpesviridae*

Sub-família: *Alfaherpesvirinae*

Gênero: *Simplexvirus*

Ordens: Somente duas até o presente:

Mononegavirales (*paramixo, rhabdo, filo e bornaviridae*)

Nidovirales (*coronaviridae & arteriviridae*)

Observe: nomes escritos em itálico!

Outros: nome de uso (nome coloquial)

TODAS AS FAMÍLIAS TEM VÍRUS CONSIDERADOS "PADRÃO" DA ESPÉCIE, denominados "TYPE SPECIES", ou "protótipo" da família.

FAMÍLIAS DE VÍRUS ANIMAIS

COM RNA DE FITA SIMPLES POLARIDADE POSITIVA:

Togaviridae, Flaviviridae, Caliciviridae, Astroviridae, Picornaviridae

E ainda a ordem *Nidovirales*: *Coronaviridae, Arteriviridae*

O nome "Nidovirales" deriva do fato de que estes vírus possuem uma origem de multiplicação comum para vários mRNAs.

COM RNA DE FITA SIMPLES POLARIDADE NEGATIVA:

Fitas simples em dois ou mais segmentos de RNA: *Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae*

E ainda a ordem *Mononegavirales* (*vírus com fita simples em um segmento único*): *Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Bornaviridae*

E mais: *Deltavirus* (corresponde ao o vírus da Hepatite Delta; ainda não classificado)

COM RNA DE FITA DUPLA:

Birnaviridae
Reoviridae

FAMÍLIAS COM VÍRUS QUE FAZEM TRANSCRIÇÃO REVERSA:

Retroviridae (RNA)
Hepadnaviridae (DNA)

FAMÍLIAS COM DNA DE FITA SIMPLES:

Parvoviridae
Circoviridae

FAMÍLIAS COM DNA DE DUPLA FITA:

Papilomaviridae
Adenoviridae
Herpesviridae
Iridoviridae
Poxviridae

**CARACTERÍSTICAS DAS FAMÍLIAS DE VÍRUS COM GENOMA DE RNA
(aqui apresentadas em ordem alfabética)**

Família: *Arenaviridae*

- Pleomórficos (globulares) 50-300 nm
- Envelopados
- Duas fitas simples de RNA (L e S)
- Contem ribossomos
- Usualmente são vírus latentes de roedores

Gênero *Arenavirus*:

- Coriomeningite linfocítica
- Febre Lassa
- Febres hemorrágicas Argentina e Boliviana

Família: *Arteriviridae*

Organização semelhante aos coronavírus:

- Vírus da Arterite Equina
- Vírus da PRRS
- Vírus elevador da Lactato Dehidrogenase

Família: *Birnaviridae*

- Icosaédricos (60-65 nm)
- Não envelopados
- RNA bisegmentado
- VPg
- Resiste a éter e clorofórmio

Gêneros: *Entomobirnavirus*

Aquabirnavirus

Avibirnavirus: Doença infecciosa da bursa das aves (Gumboro)

Família: **Bornaviridae**
(Ordem: **Mononegavirales**)

Vírus Borna:

- RNA de fita simples
- Ainda não visualizado
- Causa encefalites raras em eqüinos e ovinos
- Somente registrada na Alemanha e Suíça

Família: **Bunyaviridae**
(Ordem: **Mononegavirales**)

- Globulares (100nm)
- Envelopados
- Três segmentos de RNA de fita simples, polaridade negativa

Gêneros:

Bunyavirus (18 grupos antigênicos, 161 arbovírus, 4 ainda não agrupados; Cullicoides)
Ex.: Capim, Melão, Ororoca, Tucunduba, Guaroa e muitos outros.

Phlebovirus (8 grupos antigênicos, transmitidos por *Phlebotomum*).

Nairovirus (6 grupos antigênicos, pelo menos 33 vírus transmitidos por carrapatos).

Tospovirus (13 vírus transmitidos carrapatos)

Hantavirus (pelo menos 6 vírus, não-arbo, transmitidos por roedores)

Família: **Caliciviridae**

- Lembram um cálice floral ao microscópio eletrônico
- Icosaédricos (35-40 nm)
- Não envelopados
- RNA simples + (infeccioso)
- VPg e poli-A
- Resiste a éter e clorofórmio

Exemplos:

- Vírus que causam gastroenterites humanas
- Calicivírus felinos
- Hepatite "E" (classificação incerta)

Família: **Coronaviridae** Ordem: **Nidovirales**

- Pleomórficos (tende a globular) 60-200 nm
- Envelope
- Peplômeros espaçados
- RNA simples, positiva, com poli-A (alguns com VPg)

Gêneros: Coronavirus; Torovirus

Coronavírus humano (HCV) (resfriados)

Bronquite infecciosa das aves

Gastroenterite transmissível dos suínos (TGE)

Peritonite Infecciosa dos felinos

Encefalite hemaglutinante dos suínos

Gênero flutuante (ou seja, ainda não bem definido): Arterivirus
(Ordem: **Nidovirales**)

- *Vírus da doença misteriosa dos suínos (PRRS)*
- *Vírus elevador da lactato dhidrogenase*
- *Vírus da arterite eqüina*

Família *Filoviridae* Ordem: *Mononegavirales*

- Filamentosos (ramificações) 80 x 14 000 nm
- RNA simples negativa
- Simetria helicoidal

Gênero: ***Filovirus***

Ex.: Marburg, Ebola (doenças hemorrágicas no homem)

Família *Flaviviridae*

- Globulares (45 nm)
- Envelopados
- RNA simples positiva
- Sensíveis a éter e clorofórmio

Gênero ***Flavivirus***: Febre amarela, Dengue 1,2,3,4; Encefalite Japonesa

Gênero ***Pestivirus***: **Peste suína clássica**, Diarréia viral bovina; Border disease (doença da fronteira)

Gênero sem nome definido: **Hepatite C**

Família *Orthomyxoviridae*

- Pleomórficos 100-120 nm
- Nucleocapsídeo segmentado com 7(tipoC) ou 8(tipos A e B) de RNA de fita simples negativa
- Nucleocapsídeos com simetria helicoidal
- Hemaglutinina (H ou HA) e Neuraminidase (N ou NA)
- Rearranjos genéticos

Gêneros: *Influenzavirus A, B*

Influenzavirus C

**Família *Paramyxoviridae*
(Ordem: *Monegavirales*)**

- Pleomórficos (tendência a globular)
- Simetria do nucleocapsídeo helicoidal
- Envelopados
- Proteínas de Fusão, HA e NA
- Uma só fita de RNA simples, negativa, linear

1- Subfamília ***Paramyxovirinae***:

Gêneros: ***Paramyxovirus***: Parainfluenza (PI) 1e 3.

Rubulavirus: Caxumba, PI 2, 4a e 4b,
Em aves: Newcastle

Morbillivirus: Sarampo, Cinomose dos cães.

2- Subfamília ***Pneumovirinae***

Gênero: ***Pneumovirus***: Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV), Bovino (BRSV)

Família: *Picornaviridae*

- Icosaédricos (20-30 nm)
- Não envelopados
- RNA simples + (infeccioso)
- Resiste a éter e clorofórmio

Gêneros

- *Hepatovirus* (Hepatite "A")
- *Enterovirus* (Polio 1,2,3; Coxsackie,)
- *Rinovirus* (resfriados, mais de 120 tipos)

- *Cardiovírus* (Encefalomiocardite)
- Não envelopados
- 2 capsídeos 70 - 80 nm
- 10 a 12 segmentos RNA duplo

Outros gêneros da Família Picornaviridae:

- ***Orthoreovirus***
- ***Orbivirus***
- ***Rotavirus***

Família ***Retroviridae***

- Nucleocapsídeo icosaédrico (80-120 nm)
- Envelope (com glicoproteínas inseridas)
- 2 cópias do genoma de RNA fita simples, positivo
- VPg, poli-A

Gêneros:

(Ainda sem nome):

- Aviários tipo "C"
- Mamíferos tipo "B"
- Mamíferos tipo "C"
- Mamíferos tipo "D"
- BVL-HTLV: Vírus da Leucose/leucemia bovina e Human T cell leukemia virus (HTLV I e II);

Lentivírus: HIV (1 e 2), BIV, SIV, Visna-Maedi, CAEV, EIAV.

Spumavírus: Spumavirus humano, felino e símio.

Família ***Rhabdoviridae*** (Ordem ***Mononegavirales***)

- Forma de bala
- RNA simples negativa
- Nucleocapsídeo helicoidal

Gêneros: ***Vesiculovirus***: Estomatite Vesicular, Cocal, Jurona, Carajás

Lyssavirus: Raiva, Labos Bat, Mokola, Obodhiang, Kotonkan

Família ***Togaviridae*** (*web site: life.anu.edu.au/viruses/lctv/fr-index.htm*)

- Simetria icosaédrica
- Envelopados, sensíveis a solventes orgânicos
- Pleomórficos
- 70 nm diâmetro
- 3 (alguns 4) proteínas estruturais: C (capsídeo); envelope (E1 e E2, que são glicoproteínas que formam heterodímeros formando espículas visíveis (donde a origem do nome "toga"))
- Genoma RNA fita simples, polaridade positiva (infeccioso), com 9700-11800 nucleotídeos
- Multiplicação intracitoplasmática

Gêneros

Alphavirus: são arbovírus: Encefalites Equinas Leste, Oeste

Rubivirus: **não arbo**: Rubéola

Família **Toroviridae**

- RNA de fita simples positiva com > 20 kb
- Simetria helicoidal
- Capsídeo dobrado como um "feijão", ou disco
- Vírus Berne & vírus Breda

Vírus não classificado:

Gênero: **Deltavirus** - Vírus da Hepatite Delta

CARACTERÍSTICAS DAS FAMÍLIAS DE VÍRUS COM GENOMA DE DNA:

Família **Adenoviridae**

(tutorial: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/Adenoviruses.html>)

- Sem envelope, icosaédricos (70-90 nm)
- DNA duplo linear (36 kb)
- Potencial oncogênico (inativam p53 e Rb)
- Transformação *in vitro*

Gêneros:

Mastadenovirus (mamíferos)

Aviadenovirus (aves)

Família: **Circoviridae**

- Menores vírus com genoma de DNA
- DNA fita simples: 1,76 a 3,7 kb
- Simetria icosaédrica, 1 a 3 proteínas no capsídeo
- Circovírus dos suínos, Vírus da anemia das aves
- Humanos: "Transfusion transmitted virus" (TTV) ?

Família: **Hepadnaviridae**:

- Fita dupla parcial de DNA
- Envelopado
- Utilizam transcrição reversa em seu ciclo multiplicativo

2 Gêneros:

Orthohepadnavirus (Hepatite B)

Avihepadnavirus)

Família **Herpesviridae**

- Envelope (120-200 nm)
- DNA duplo linear (at, 240 kb)
- Codificam mais de 70 polipeptídeos

Subfamília: **Alphaherpesvirinae**

- Herpes simples tipo 1 (*herpesvírus humano 1*)
- Herpes simples tipo 2 (*herpesvírus humano 2*)
- Varicella Zoster (*Herpesvirus humano 3*)

Subfamília: **Betaherpesvirinae**

- Cytomegalovírus (*Herpesvirus humano 5*); (*Herpesvirus humano 6*) e (*Herpesvirus humano 7*)

Subfamília: *Gammaherpesvirinae*:

2 gêneros:

- ***Lymphocryptovirus***: *Vírus Epstein-Barr* (EBV) e (*Herpesvirus humano 4*)
- ***Rhadinovirus***: *Herpesvírus saimiri*
Herpesvirus humano 8 (*Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi*; KSHV)

Família *Iridoviridae*

- Icosaédricos (120-300 nm)
- Envelope
- DNA duplo linear (175 kb)
- Peste suína africana=> distinto

Família *Parvoviridae*

- Icosaédricos, não envelopados, 18-26 nm, icosaédricos.
- 60 capsômeros por nucleocapsídeo
- Fita simples de DNA, 5000 nucleotídeos. Genoma pode ser de fita simples negativa, com terminações palindrômicas (repetições invertidas).

Três gêneros: *Parvovirus* (espécie tipo: minute virus of mice, MVM)

Erythrovirus (espécie tipo: vírus B19)

Dependovirus

Sites: <http://www.wadsworth.org.databank/virus.htm>

<http://www.medscape.com/SCP/IIM/1997/v14.n08/m3079.moore/m3079.moore.html#Vir>

Família *Papovaviridae*

- Sem envelope (45-55 nm)
- DNA duplo "supercoiled" circular
 - Ex: Poliomavírus

Família *Papilomaviridae*

- Sem envelope (45-55 nm)
- DNA duplo "supercoiled" circular
 - Ex: Papilomavírus (causadores de "verrugas"; muitos associados a diversos cânceres),

Família *Poxviridae*

- Os maiores vírus conhecidos : estrutura do nucleocapsídeo complexa
- Com ou sem envelope (200-300 nm)
- Multiplicação intracitoplasmática
- Variola (já erradicada), Vírus do molusco contagioso

Hepatite G (GBa e GBb; GBV)

- Vírus não classificado
- Semelhante aos pestivírus quanto a sua organização genômica.
- Não há evidência clara de que cause hepatites.

AGENTES NÃO CONVENCIONAIS (PRÍONS):

- **Príons**=> NÃO SÃO VÍRUS! São proteínas, desprovidas de ácido nucléico, altamente resistentes a calor, formaldeído e nucleases.
- Eliminados por agentes disruptores de gorduras (fenol, éter, soda e hipoclorito de sódio).
- Capazes de se propagar por alteração de proteínas celulares normais, similares, presentes nas células (denominadas PrP^c, para PrP "celular").
- Responsáveis por neuroencefalopatias espongiformes (Creutzfeld-Jacob disease (CJD), Gerstman- Straussler-Schenker ou GSS; Encefalopatia espongiforme bovina (BSE ou "síndrome da vaca louca") e outras.

O texto completo sobre príons com fotos estão neste link:
<http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/Prions.html>

REFERÊNCIAS

Web site <http://life.anu.edu.au/viruses/ictv/>