

Parte II

TÉCNICAS DE VIROLOGIA

1 - PRODUÇÃO DE VÍRUS (EMCV, FV3 E OUTROS IRIDOVÍRUS) EM CÉLULAS VERO

Objectivos

- 1 - Familiarização com as técnicas de Virologia
- 2 - Produção de suspensões virais com títulos compatíveis com as multiplicidades de infecção (m.o.i.) exigidas nas experiências a realizar nas aulas seguintes.

Introdução

O EMCV e os Iridovírus utilizados nestes trabalhos podem ser produzido em células Vero, em meio de cultura DME contendo FCS a 2%. É conveniente infectar culturas celulares subconfluentes, e utilizar uma m.o.i < 1.

Todas as operações envolvidas no manuseamento das células, vírus e respectivos meios são efectuadas em condições de assepsia, com material estéril, e em câmara de fluxo laminar classe II A (Biohazard).

A rejeição de material e de meios infectados efectua-se para recipientes apropriados (adequados a serem autoclavados ou contendo uma solução de hipoclorito de sódio a 5%).

Procedimento

- 1 - Rejeitar o meio de cultura de um T75 subconfluente.
- 2 - Adicionar 1ml de uma suspensão viral com um título inferior a 10^6 pfu ml⁻¹
- 3 - Incubar durante 30 minutos a 37 °C (EMCV) ou 28 °C (Iridovírus) em atmosfera de CO₂.
- 4 - Adicionar 7ml de meio com soro a 2% (DME-FCS₂) e voltar a incubar em atmosfera de CO₂.

(dois dias mais tarde)

5 - Observar as culturas ao microscópio. A progressão da infecção resulta na produção de vírus e leva a uma alteração morfológica (efeito citopático – ECP) seguida de perda de aderência das células. Um ECP total corresponde à totalidade das células com forma esférica, quer ainda estejam aderentes ou já se encontrem em suspensão. Nessa altura, retirar os frascos da estufa e manter a 4 °C, bem rolhados, até à aula seguinte.

(aula seguinte)

- 6 - Colher o meio de cultura para um tubo Falcon de 15ml. **NOTA:** Sujeitar previamente as culturas, **mas apenas dos Iridovírus**, a um ciclo de congelação/descongelação (-70 °C ou neve carbónica / 37 °C).
- 7 - Clarificar a suspensão viral, por centrifugação de 5 minutos a 3000 Xg.
- 8 - Colher os sobrenadantes (suspensões virais) para 5 microtubos de 2ml (amostras de 1,8ml). Manter o restante no tubo Falcon (para titular). Etiquetar convenientemente e conservar a -70 °C e/ou proceder à concentração das partículas virais (passo seguinte)
- 9- Concentrar as partículas virais das amostras distribuídas por 4 microtubos, durante 2,5h a 20 000Xg a 4 °C. Rejeitar os sobrenadantes e ressuspender os sedimento em 180µl de PBS-A (vírus 10X concentrado). Conservar a -70°C.

2 - TITULAÇÃO DOS VÍRUS PRODUZIDOS

Objectivos

- 1 - Aprendizagem e discussão de técnicas de quantificação de vírus.
- 2 - Determinação dos títulos das suspensões virais produzidas nas aulas.

Introdução

O número de partículas infecciosas presentes numa suspensão viral pode ser determinado por titulação.

A titulação consiste em infectar uma série de culturas celulares com alíquotas de diluições sucessivas dessa suspensão viral. Após incubação durante um período de tempo que permita alguns ciclos de replicação viral, e desde que se assegure que a descendência de cada partícula infecciosa fica imobilizada no meio de cultura e só consegue infectar as células vizinhas, podem observar-se placas de lise. As placas de lise são zonas com células destruídas pela infecção, e podem ser evidenciadas por coloração das células viáveis com um corante vital, após fixação (em que apenas as células viáveis se mantêm aderentes).

Procedimento

- 1 - Distribuir alíquotas de 0,9ml de PBS-A por 6 tubos de ensaio.
- 2 - Proceder a diluições da suspensão viral (desde 10^{-1} até 10^{-6}).
- 3 - Rejeitar o meio de cultura de uma placa de 48 poços com culturas subconfluentes de células Vero.
- 4 - Inocular cada poço com 0,1ml de suspensão viral, utilizando vários poços por cada diluição (utilizar apenas as diluições 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3}). Inocular alguns poços com 0,1ml de PBS-A (testemunho).
- 5 - Incubar em estufa de CO_2 durante 30 minutos (período de adsorção viral).
- 6 - Adicionar a cada poço, 0,5ml de DME-FCS₂ com Sephadex G50 a 2% (DME-T).
Agitar o meio de titulação antes de cada pipetagem!
- 7 - Colocar em estufa de CO_2 , tendo o cuidado de manter a placa completamente imobilizada até ao final desta incubação.

(Dois dias depois)

- 8 - Fixar as células durante 30 minutos à t.a., adicionando a cada poço cerca de 0,5ml de formaldeído a 5%.
- 9 - Rejeitar o meio de cultura com formadeído, e lavar bem os poços em água corrente.
- 10 - Corar as células durante 15 minutos com Giemsa a 10% (cerca de 0,2ml por poço).
- 11 - Rejeitar o corante e lavar novamente em água corrente.
- 12 - Contar o número de placas virais observáveis nos diferentes poços.
- 13 - Calcular o título **T** do vírus, expresso em unidades formadoras de placas ("Plaque forming units" - *pfu*) por mililitro (**pfu ml⁻¹**): **$T = n f / i$**
 - **n** é a soma dos números de placas virais contadas nos poços em que se inocularam diluições que resultaram num número contável de placas.
 - **f** é o factor relativo à **menor** diluição que contribuiu para o valor **n** (por exemplo, será **10⁴**, se tiver sido a diluição 10^{-4})
 - **i** é a soma dos volumes (em ml) dos inóculos virais aplicados nos poços em que se contaram placas, mas tendo em conta a diluição (**0,1** por cada poço com a menor diluição que contribuiu para o valor **n**; **0,01** por cada poço da diluição seguinte; ...).