



**ORGANIZAÇÃO, CATALOGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA COLEÇÃO DE
VÍRUS PATOGENICOS DO LABORATÓRIO DE ESTUDOS DE VÍRUS
EMERGENTES (LEVE) COMO PARTE DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DA
UNICAMP.**

Palavras-Chave: coleção microbiológica, microrganismos patogênicos, vírus emergentes.

Autores/as:

Juliana Rodrigues de Jesus Silva - UNICAMP

Prof.º Dr.º José Luiz Proença Modena (orientador) - UNICAMP

Dr.ª Rosemeire Florêça de Oliveira de Paula (co-orientadora) - UNICAMP

Bruno Brito Pereira da Silva (coautor) - UNICAMP

Camila L. Simeoni (coautora) - UNICAMP

Aline Vieira (coautora) - UNICAMP

Marienne Ribeiro Amorim (coautora) - UNICAMP

Júlia Forato (coautora) - UNICAMP

Priscilla Paschoal Barbosa (coautora) - UNICAMP

Daniel Augusto de Toledo Teixeira (coautor) - UNICAMP

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a degradação ambiental, e outras mudanças provocadas por ações antrópicas, têm favorecido a emergência de novos vírus e de doenças com grande impacto na saúde humana. O Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) da UNICAMP trabalha com o intuito de caracterizar fatores associados à patogênese de vírus emergentes no Brasil. Para isso, o LEVE tem isolado e caracterizado vírus emergentes de diferentes sítios de coletas e hospedeiros, além de dispor de uma coleção de arbovírus e de vírus respiratórios cedidos por outros pesquisadores brasileiros.

No atual cenário, onde torna-se necessário o estabelecimento de um ambiente favorável às parcerias público-privado, e ao desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos, a exploração da biodiversidade microbiana e de vírus pode vir a constituir um importante alicerce. Desse modo, surge a necessidade de catalogar e desenvolver um sistema de gerenciamento dos vírus presentes no LEVE. Para tal, objetiva-se criar a primeira Coleção de Vírus Patogênicos (CVP) da UNICAMP, a qual possui apelo de saúde

pública e pode fomentar o desenvolvimento de pesquisa de base tecnológica no ambiente da Universidade. Além disso, a existência de um grande número de espécies virais desconhecidas em animais selvagens com potencial de causar doenças em humanos sinaliza a possibilidade de crescimento dessa coleção nos próximos anos.

Por conseguinte, espera-se estruturar a CVP para que esta possa crescer e atuar como uma referência para outras coleções, que contribuirão para atender a demanda nacional da pesquisa científica, da biotecnologia, e como base indispensável para a bioeconomia.

OBJETIVOS

Esse projeto, realizado em parceria com os profissionais da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria, CBMAI (localizado no CPQBA-UNICAMP), tem como objetivo catalogar, organizar e caracterizar a coleção de vírus presente no LEVE, o que permitirá a implementação de um sistema de gerenciamento interno de dados e sua divulgação como parte do acervo de microrganismos da UNICAMP.

METODOLOGIA

1) Produção de protocolos operacionais e documentos da CVP

Usando como molde a documentação fornecida pela CBMAI, foram elaborados os POPs (**Procedimento Operacional Padrão**) de todos os equipamentos do NB2 e NB3 do LEVE, principalmente daqueles que seriam utilizados na realização do projeto. Com base nos POPs puderam ser redigidos também os “Manuais de Uso” dos equipamentos.

2) Levantamento e criação do catálogo de vírus da CVP

O primeiro passo para a criação da CVP teve como base um levantamento de todos os vírus presentes no laboratório, destacando as suas respectivas localizações no biofreezer ou no container de nitrogênio líquido presentes no LEVE. Além disso, para todos os vírus encontrados foram obtidas as informações necessárias para preenchimento das planilhas “**Darwin Core**” e “**Inventário**” - também fornecidas pelo CBMAI. O “Darwin Core” consiste em um sistema de organização de dados elaborado com intuito de compilar e catalogar dados de biodiversidade, principalmente para utilização em coleções microbiológicas, porém, a plataforma “Darwin Core” não foi elaborada para catalogar vírus, por este motivo algumas modificações precisaram ser feitas para a sua utilização no LEVE. Posteriormente, todos estes vírus foram armazenados em caixas específicas da CVP contidas no biofreezer e nitrogênio líquido para controle de estoque.

3) Propagação e caracterização de alguns vírus selecionados da coleção

Com o intuito de expandir, caracterizar e começar a produzir os estoques sementes dos vírus da CVP, foram selecionados alguns vírus relevantes para propagação em linhagens celulares, como: Yellow Fever (H111), Yellow Fever (BeAn131), Yellow Fever (17DD), Ilheus, Bussuquara, Dengue-1, Mochizuki, Dengue-2, Dengue-3, Dengue-4, West Nile, St. Louis Encephalitis (Porton TVP 564), St. Louis Encephalitis (Span1916), Zika e Rocio, todos da família *Flaviviridae*, além dos Alphavirus Mayaro (BeAr20290) e Chikungunya (s-27 African), o Enterovírus Coxsackie (CVB3), o Betacoronavirus Sars-Cov-2 e o Orthobunyavirus Oropouche (BeAn1999).

Para tanto, uma alíquota pequena, de aproximadamente 100ul do estoque mãe de todos esses vírus foram inoculadas em células C6/36, Vero CCL81, Hela ou BHK21 crescidas em placas de 6 poços, sempre contendo poços controle (contendo apenas a célula sem o vírus). Essas placas foram colocadas em mesa agitadora para a adsorção por pelo menos uma hora. Posteriormente, as placas foram mantidas em condição controlada (37°C com 5% de CO₂) até o aparecimento de efeito citopático (**Figuras 1a e 1b**).



Fig. 1a.: Inoculação do vírus Mayaro em placa de 6 poços. **1b.:** Placa de 6 poços em mesa agitadora para adsorção.

Além disso, também foi realizada a titulação dos vírus propagados, visando obter conhecimento acerca do número de unidades infecciosas presentes nas suspensões. Para tal, foram infectadas placas de 24 poços, contendo VeroCCL81 com a concentração de 2×10^5 , geralmente em duplicata para cada um dos vírus. Neste processo as placas foram inoculadas com 200ul do vírus em meio DMEM no primeiro poço, com o qual foi realizado um processo de diluição de -1 até -6, desprezando 200ul ao final, em todos os procedimentos havia a presença de um poço controle. Essas placas foram submetidas ao agitador para adsorção por meia hora e depois à estufa em condição controlada (37°C com 5% de CO₂) por mais meia hora. Após uma hora, as placas foram levadas ao fluxo laminar para troca do meio DMEM para o meio semi-sólido, o qual tem como objetivo fazer com que o vírus infecte apenas as células vizinhas, permitindo a formação e posterior visualização das placas de lise. Posteriormente à adição do meio semi-sólido as placas foram re-colocadas em estufa e mantidas por um período de 2-7 dias (dependendo do vírus) e monitoradas diariamente. Ao final do tempo, tornou-se possível visualizar a formação de buracos na cultura de células, que indicam ação do vírus. Esses focos foram contados e submetidos à fórmula (**Figura 2**):

$$\text{Concentração viral} = \frac{\text{Número total de placas virais}}{\text{Volume usado} \times \text{Factor de diluição}}$$

Fig. 2: Cálculo da titulação em pfu/mL (unidades formadoras de placa por mL).

4) Caracterização molecular dos vírus propagados

Para caracterizar os vírus da CPV, visou-se sequenciar o genoma daqueles mantidos na CPV e que possuem os estoques sementes. Para tal, uma alíquota de 140uL do estoque semente desses vírus foram submetidos à extração de RNA com o kit **QUICK-RNA™ Viral Kit (cat no R1034)** da Zymo Research. A quantificação e a qualidade

desse RNA foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop. Por fim, o material extraído foi utilizado para amplificação de alvos virais específicos por PCR em tempo real usando iniciadores específicos e o kit **qPCR BIO probe 1 Step Go**. Todas as leituras foram feitas no equipamento PCR em tempo real QuantStudio™ 3. Por fim, algumas amostras que apresentaram valores de quantificação no qRT-PCR elegíveis para sequenciamento foram utilizadas para sequenciamento na plataforma MinION (Oxford Nanopore). Até o momento, o único vírus sequenciado dos que foram propagados foi o alphavírus Mayaro (MAYV). O genoma desse vírus está em processo de montagem.

RESULTADOS

1) Organização da CVP do LEVE em “Darwin Core”

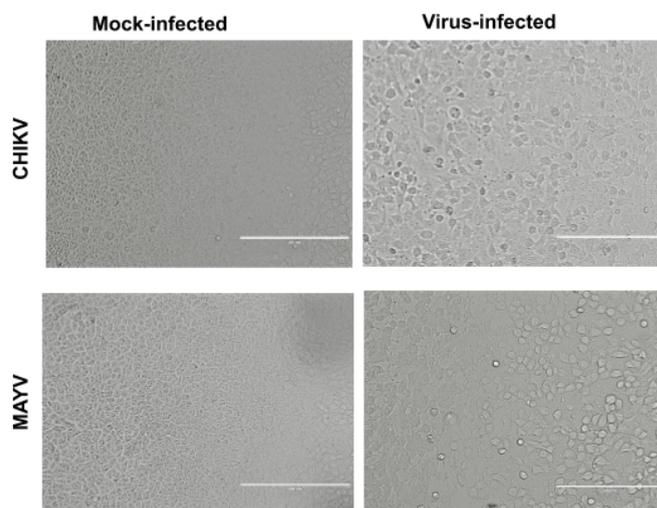
Como a plataforma “Darwin Core” não foi criada para catalogação de vírus foi necessária a sua modificação, com retirada ou adição de alguns campos de classificação. Dentre as informações agrupadas pela plataforma, existem campos para as seguintes informações: “identificação”, “tipo”, “última vez que houve modificação”, “direito de titular”, “código da instituição”, “código da coleção”, “depositante”, “origem”, “nível de risco do microorganismo”, “preparação necessária para manutenção do microorganismo em questão”, “nome científico”, “classificação taxonômica”, dentre outras. Os campos que foram adicionados para garantir a correta catalogação foram: “titulação”, “mycoplasma”, “isolado por”, “sequência do microorganismo” e “efeito citopático”.

Ainda estão sendo discutidas informações adicionais que devem ser colocadas e que podem ser imprescindíveis para catalogação de vírus, porém o objetivo é possuir estes dados uniformizados para que sejam disponibilizados, garantindo que outras instituições e pesquisadores tenham acesso a esta CVP.

2) Propagação e caracterização de vírus selecionados da coleção

Para alimentar a plataforma da CVP e garantir o estoque dos vírus selecionados, foi realizada a propagação do estoque mãe de todos esses vírus em células em placas de 6 poços. Após o aparecimento de efeito citopático, todas as culturas foram fotografadas com auxílio de um Microscópio Digital Invertido, e organizadas em pranchas como demonstrado na figura (**Figura 3**), essas imagens também foram colocadas na plataforma “Darwin Core”.

Fig.3: Efeitos citopáticos de membros da família *Alphavirus*.



Posteriormente, as culturas foram raspadas, centrifugadas e transferidas com os sobrenadantes celulares para criotubos identificados com as seguintes informações: “nome do vírus”, “linhagem”, “tipo de célula”, “data” e “nome do responsável”.

A partir das amostras propagadas foram realizadas as titulações (pfu/mL), informações também utilizadas para alimentar a plataforma “Darwin Core”, as **Tabelas 1 e 2** mostram algumas das amostras que já estão tituladas:

Vírus	pfu/mL	Vírus	pfu/mL
YFV (H111)	1,16x10 ⁷	SLEV (TVP 564)	2,4x10 ⁷
YFV (17DD)	1,56x10 ⁷	MAYV	1,5x10 ⁵
DEN-1	5,0x10 ⁷	CHIKV	3,0x10 ⁶
DEN-4	2,0x10 ⁷	OROV	2,4x10 ⁷
WNV	1,8x10 ⁷	BSQV	9,8x10 ⁵

Tabelas 1 e 2: Titulação de alguns dos vírus da CVP.

CONCLUSÃO

A partir da sua elaboração, a CVP poderá ser enfim disponibilizada para que outros/as pesquisadores/as ou universidades possam ter acesso a mesma, servindo não só como intermédio entre Universidades, mas também como um molde para futuros projetos e pesquisas que precisem elaborar uma coleção do mesmo modelo. Além disso, por meio da estruturação inicial, pretende-se que o LEVE continue alimentando a coleção com o passar dos anos, garantindo que o objetivo de caracterização dos vírus emergentes tenha continuidade.

REFERÊNCIAS

1. CANDIDO DS et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science*, v.369, p.1255-1260, 2020.
2. FARIA NR et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*, DOI: 10.1126/science.abh2644, 2021.
3. AMORIM MR et al. Respiratory Viral Shedding in Healthcare Workers Reinfected with SARS-CoV-2, Brazil, 2020. *Emerging Infectious Diseases*, v.27, DOI: 10.3201/eid2706.210558, 2021.
4. SOUZA WM et al. Levels of SARS-CoV-2 lineage P.1 neutralization by antibodies elicited after natural infection and vaccination. Submetido na: *The Lancet Microbes*.
5. CARROLL D et al. The Global Virome Project. *Science*, 359 (6378): 872-874 DOI: 10.1126/science.aap7463, 2018.
6. BATOVSKA J et al. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. *Journal of Virological Methods*, 249: 79-84, DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.08.019, 2017.