



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

EDMARA CHAVES COSTA

**CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA MEDIANTE
DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO**

**FORTALEZA-CE
2010**

EDMARA CHAVES COSTA

CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE VÍRUS DA RAIVA MEDIANTE
DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Carnívoros, Onívoros, Herbívoros e Aves

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

FORTALEZA – CEARÁ
2010

C837c Costa, Edmara Chaves

Conservação de amostras de vírus da raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação/Edmara Chaves Costa. Fortaleza, 2010.

120 p.; il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

1. Raiva 2. Criopreservação 3. Crioprotetores.

I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 616.953

EDMARA CHAVES COSTA

CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DO VÍRUS DA RAIVA MEDIANTE
DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 07/10/2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará – UECE
(Orientadora)

Dra. Phyllis Catharina Romijn
Empresa de Pesquisa Agropecuária
do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO
(Examinadora)

Dra. Tânia Valeska Medeiros Dantas
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Examinadora)

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará – UECE
(Examinador)

Prof^a. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Examinadora)

A Deus, pois, no começo da jornada, achei que rumaria sozinha nas estradas do conhecimento; mas, caminhando, descobri que, na verdade, Deus é o ponto de partida, a trajetória, o mapa e a linha de chegada.

Ao meu amado marido, Alexandro Cleofas Pimentel Costa, e aos nossos filhos queridos, Aleksandr Cleofas Pimentel Costa e Yan Derek Pimentel Costa, que são meu todo e todas as partes de mim. A face mais forte e guerreira; o lado mais vívido e gentil; e a porção mais curiosa e aventureira. Vocês são o meu perfil, meu ideal, minha realidade fantasiada de conto de fadas. Todos os dias, sempre...

Às três mulheres da minha vida: minha mãe Deuzinda Chaves Costa; minha irmã Larissa Chaves Costa, ou “Lá”, como a chamo; e minha vó Neném [in memoriam]. Minhas Três Marias. Qual seria meu caminho sem esses anjos de luz para me guiar? Ao meu pai, Edmar Rodrigues Costa, e ao meu irmão, Wander Chaves Costa, meus salva-vidas, equipe de apoio vital, sempre dispostos a me proteger nos momentos de maior aflição.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À *Universidade Estadual do Ceará* por viabilizar minha formação integral e continuada, fornecer subsídios para a execução desse trabalho e contribuir decisivamente à construção de novos conhecimentos.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq*, por me conceder durante esses quatro anos estabilidade financeira, mediante concessão de bolsa de pesquisa, bem como, ser o único órgão financiador desse trabalho através dos recursos da taxa de bancada.

À professora doutora *Maria Fátima da Silva Teixeira*, minha desde sempre orientadora, por me escolher na graduação e me receber de volta na pós-graduação, quase como na parábola do ‘filho pródigo’. Por testemunhar os momentos mais significativos da minha existência e ser um dos agentes mais impactantes na maneira que, hoje, eu tenho de ver o mundo: pelo olhar científico.

À doutora *Phyllis Catharina Romijn*, pela atenção a mim dispensada desde o primeiro momento; pela empatia, sensatez e zelo no trato das questões ligadas a esse trabalho. Pelo estímulo e manifestações de solidariedade, pelos conselhos oferecidos e extrema amabilidade no trato com as pessoas.

À doutora *Tânia Valeska Medeiros Dantas*, o que seria da minha trajetória sem o teu sorriso aberto e acolhedor. Contigo aprendi a lançar um olhar positivo ante os desafios dessa vida e abraçar a esperança com mais simpatia.

Ao professor doutor *Marcos Fábio Gadelha Rocha*, um exemplo de ser humano e profissional - aquele tipo de pessoa de quem se diz: ‘quando eu crescer, quero ser assim’.

À professora doutora *Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante* por ter, atenciosamente, aceito examinar meu trabalho e participar da sua avaliação final.

Aos *professores* do PPGCV/UECE, por compartilharem seus conhecimentos e experiências, por estimularem nossa curiosidade científica e nos apresentarem as ferramentas para a construção de novos saberes.

À secretária do PPGCV/UECE, *Adriana Maria Sales Albuquerque*, pela simpatia legítima e sincera, por falar comigo sempre, desde a graduação à pós-graduação, mesmo nos momentos em que estive ausente do contexto da Veterinária.

Ao doutorando *Benedito Neilson Rolim*, esse personagem protagonista na história do combate à Raiva no Estado, que sempre dispôs do seu escasso tempo para os novos amigos ‘raivosos’. Por seu olhar experiente e sua disponibilidade à resolução das questões práticas do cotidiano.

À doutoranda, *Tereza D’Ávila de Freitas Aguiar*, uma das pessoas mais complexas que eu conheço, quase tão intensa quanto a luz ultravioleta que nós tanto usamos; por ser meu duplo cego nesse trabalho tão desgastante, que quase nos deixou ‘cegas’.

Ao mestrando e cunhado *Carlos Alberto Furtado Lopes Júnior*, por quebrar meus galhos, mesmo quando eles eram do diâmetro de uma sequóia centenária.

Ao mestrando *Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior*, por me oferecer os itens de primeira necessidade mais preciosos que alguém pode conceder a um colega: amizade e consideração.

Aos mestrandos *Ronaldo Pereira Dias*, pela convivência pacífica e harmoniosa; e *Luís Antônio de Oliveira Alves*, pelo espírito vibrante e festivo capaz de alegrar qualquer ambiente.

Aos alunos da iniciação científica, *Gabrielle Rosembli Martins*, por não se cansar de me oferecer ajuda, por sua disponibilidade; e *Igor Ciriaco Barroso*, por dispor do seu auxílio e ser sempre prestativo em todos os momentos.

Aos profissionais que compõem a equipe do BIOCEN (Biotério Central da Universidade Federal do Ceará) por abrirem suas portas, proporcionando um imenso aprendizado na área de bioterismo, pela paciência e atenção durante os meses de treinamento.

A todos a quem o tempo escasso e a inspiração limitada me impediram de citar nessas mal traçadas linhas, mas que têm seus nomes talhados no livro das minhas memórias, o qual nem o tempo ou a falta de talento poético podem obscurecer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABLV - *Australian Bat Lyssavirus*

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA - Comissão de Ética para o Uso de Animais

DUVV - *Vírus Duvenhage*

EBLV-1 - *European Bat Lyssavirus 1*

EBLV-2 - *European Bat Lyssavirus 2*

EPI - Equipamento de proteção individual

G - Gravidades

IC - Intracerebral

IFD - Imunofluorescência Direta

LBV - *Vírus Lagos Bat*

MOKV - *Vírus Mokola*

PBS - Phosphate Buffered Saline. Sigla em inglês para Tampão Fosfato-Salino.

RNP - Ribonucleoproteína

SNC - Sistema Nervoso Central

OMS - Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

Figura 01 – Apresentação dos sorotipos e genótipos dos vírus pertencentes ao gênero Lyssavirus.....	19
Figura 02 – Estrutura de vírus da Raiva.....	22
Figura 03 – Ciclo viral na célula hospedeira.....	24
Figura 04 – Transcrição do genoma de vírus da Raiva.....	25
Figura 05 – Transporte intraneural de vírus da Raiva.....	27

Capítulo III

Figura 1 – Flowchart showing the stages of experimental procedure.....	75
Figura 2 – Photomicrograph with immunofluorescent staining of samples impression smear.....	76

Apêndice I

Figura 1 – Camundongos albino suíços (<i>Mus musculus</i>) com 21 dias de idade.....	102
Figura 2 – Gaiolas dispostas nas prateleiras do Biotério de Experimentação do Laboratório de Virologia.....	103
Figura 3 – Halotano e câmara anestésica (adaptada).....	104
Figura 4 – Eutanásia por anestesia inalatória de camundongos em prostração após isolamento viral <i>in vivo</i>	105
Figura 5 – Processo de composição das amostras destinadas a criopreservação pela inoculação intracerebral de camundongos.....	108
Figura 6 – Processo de elaboração de amostras compostas (“pool”) destinadas à criopreservação.....	109
Figura 7 – Evolução dos sinais clínicos da infecção por vírus da Raiva (cepa CVS-31)	112
Figura 8 – Confecção da lâmina para imunofluorescência.....	115

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

Table 1 – Rabies virus titration by means of mice intracerebral inoculation.....	77
Table 2 – Viability of Rabies virus infectious particles testes by mouse intracerebral inoculation and direct fluorescent antibody test after exposure to internal and external cryoprotectants.....	77
Table 3 – Effect of freezing and storage temperature on Rabies virus viability tested by mouse intracerebral inoculation and direct fluorescent antibody test after a 30 days period.....	77

Apêndice I

Tabela 1 – Valores $\text{Log}_{10}\text{DL}_{50}$ com seis animais por diluição.....	114
Tabela 2 – Exemplos dos resultados de titulação típica com diluições na razão 10.....	114

RESUMO

Nas últimas décadas, tem-se alcançado expressivos avanços no âmbito da pesquisa com vírus da Raiva. Contudo, apesar de se conhecer, há séculos, o comportamento desses vírus e a despeito do acúmulo de informações em torno do tema, ainda resta um longo percurso até se alcançar a cura ou a erradicação da doença. Nesse sentido, a conservação de amostras virais assegura, sobremaneira, a continuidade e expansão dessa jornada científica, dando vazão ao incremento de estudos capazes de superar barreiras cronológicas e geográficas. Por conseguinte, é imprescindível a manipulação e armazenamento cuidadosos, empregando-se técnicas e protocolos que tenham sido validados *a priori*, pois o processo de estocagem, em si, pode afetar a qualidade dos exemplares e definir sua perspectiva de uso posterior. Assim, a proposta desse estudo foi avaliar diferentes protocolos de criopreservação a -20°C em amostras de vírus da Raiva. Mais especificamente, objetivou-se averiguar os métodos de criopreservação empregados na conservação de amostras de vírus da Raiva nos principais serviços especializados do País; identificar os efeitos da criopreservação a -20°C sobre a viabilidade viral de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso por um período de 30 dias (conservação a curto-prazo), pelo isolamento viral, titulação e teste de imunofluorescência direta; e avaliar a pertinência do uso de crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido e glicerol) e não penetrantes (sacarose e polietilenoglicol) na criopreservação de amostras de vírus da Raiva a uma temperatura de -20°C. Para essa finalidade, o desenho metodológico englobou a execução de oito protocolos experimentais em função das variáveis tempo e aplicação de crioprotetores. Foram estabelecidos intervalos proporcionais de tempo para a execução de testes de viabilidade viral (titulação viral, imunofluorescência direta, prova biológica), possibilitando se averiguar o comportamento das amostras virais mediante as distintas técnicas de preservação instituídas. Observou-se que a técnica de criopreservação a -20°C apresenta limitações no que tange a sua aplicação na conservação de amostras de tecido nervoso infectadas por vírus da Raiva, em função do comprometimento da viabilidade viral das amostras mesmo em protocolos de estocagem de curto-prazo. Após 30 dias de congelamento, a intensidade da fluorescência das partículas virais nas amostras criopreservadas (+++) foi menor do que a observada em amostras frescas (++++) . Contudo, o uso da sacarose nas concentrações de 10% ou 68% produziu um efeito conservante nas amostras, possibilitando a manutenção da fluorescência (++++) após criopreservação de 30 dias.

Palavras-chave: Raiva; Criopreservação; Agentes crioprotetores.

ABSTRACT

In recent decades, important advances have been achieved in the research of Rabies virus. However, despite it's been known for centuries and the knowledge accumulation surrounding the topic, there is still a long way to achieve the cure or eradication of this disease. In this sense, conservation of viral samples ensures, above all, continuity and expansion of the scientific journey, giving vent to the increase of studies capable of overcoming geographical and chronological barriers. It is therefore essential to careful handling and storage of the samples, using techniques and protocols that have been validated before use, since the process of storage itself can affect the quality of the specimens and set their perspective to future uses. Thus, the purpose of this study was to evaluate different protocols for cryopreservation at -20°C of Rabies virus samples. More specifically, it aimed to investigate the methods of cryopreservation used in the conservation of Rabies virus samples in specialized services of the country, identifying the effects of cryopreservation at -20°C in the virus viability after short-term periods, using virus isolation test, titration and immunofluorescence antibody test; and evaluate the use of penetrating cryoprotectants (DMSO and glycerol) and non-penetrating cryoprotectants (sucrose and polyethylene glycol) in cryopreservation of Rabies virus samples at a temperature of -20°C. For this purpose, the methodological design involved the implementation of eight experimental protocols in a controlled time and with the application of cryoprotectants. It was established proportional time intervals to perform the viral viability tests (virus titration, immunofluorescence, biological tests). It was observed that the technique of cryopreservation at -20°C has limitations regarding its application in the conservation of brain tissue samples infected with Rabies virus, according to the impairment of viability viral samples even in protocols for short-term storage. After a 30 days freezing period, the fluorescence intensity of viral particles in the samples cryopreserved (+++) was lower than that observed in fresh samples (++++). However, the use of sucrose at 10% or 68% produced a preservative effect in the samples, enabling the maintenance of the fluorescence (+++++) after 30 days of cryopreservation.

Key-words: Rabies; Criopreservation; Crioprotectants agents.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUÇÃO.....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1 Agente Etiológico.....	17
2 Classificação Genotípica e Filogenética.....	18
3 Padrões Morfogenéticos.....	21
4 Ciclo Infeccioso e Potencial Replicativo.....	23
5 Bases da Patogênese por Vírus da Raiva.....	26
6 Conservação de Amostras de Vírus da Raiva.....	29
JUSTIFICATIVA.....	33
HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	35
OBJETIVOS.....	37
1 Objetivo geral.....	37
2 Objetivos específicos.....	37
CAPÍTULO I: Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas.....	39
CAPÍTULO II: Conservação de amostras de vírus da Raiva em serviços especializados.....	58
CAPÍTULO III: Conservation of Rabies virus viability after short-term cryopreservation in internal and external cryoprotectants.....	61
CONCLUSÕES GERAIS.....	79
PERSPECTIVAS DA TESE.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXOS.....	96
Anexo I: Parecer do comitê de ética.....	97
Anexo II: Parecer do comitê de ética para o uso de animais.....	98
Anexo III: Comprovante de aceite do capítulo I.....	99
APÊNDICES.....	100
Apêndice I: Métodos e técnicas.....	101
Apêndice II: Questionário semi-estruturado.....	119
Apêndice III: Termo de consentimento.....	120

Introdução

INTRODUÇÃO

A Raiva é uma encefalite viral de caráter agudo, progressivo e incurável, enquanto enfermidade reemergente, é responsável por um contingente de mortes humanas que supera o índice de mortalidade de infecções como febre amarela e dengue. Analisando-se numa perspectiva ampla, a Raiva pode ser considerada a mais importante zoonose viral conhecida, em virtude da sua ampla distribuição, consequências à saúde pública e implicações econômicas (HEMACHUDHA et al., 2002; RUPPRECHT et al., 2002).

A expansão dessa doença se dá de forma contínua e, freqüentemente, exacerbada, a despeito das inúmeras intervenções e dos avanços nos diversos setores da ciência, sendo de vital importância a continuidade do desenvolvimento científico na área. Nesse sentido, vale ressaltar que a concretização de trabalhos no campo das ciências biológicas, agrárias, biomédicas e indústria farmacêutica voltados à pesquisa com vírus da Raiva baseia-se, primariamente, na aquisição e manutenção de amostras biológicas.

Portanto, o reconhecimento da grande relevância dos microrganismos para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. E, é graças à emergente importância atribuída à estocagem de amostras que muitas instituições, públicas e privadas, têm investido na constituição de estoques (biobancos), implementando inúmeras técnicas de preservação, com a implementação de protocolos próprios e de avançadas tecnologias de controle dos dados (FIGUEIREDO, 2001; HOLLAND et al., 2003; PAOLI, 2005).

Atualmente, centenas de milhares de amostras das mais variadas origens, incluindo células humanas, animais ou bacterianas, além de vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), são armazenadas a cada ano com propósitos diagnósticos e de pesquisa, abrangendo aplicações tanto em laboratórios médicos quanto veterinários. Contudo, não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de microrganismos a longo-prazo.

Portanto, a eleição do procedimento mais adequado à conservação de amostras deve ser norteadas pelas características do espécime em estudo, bem como, pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis. Muitas células, tecidos e microrganismos para os quais há uma crescente demanda ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da criobiologia um campo de vasto potencial para o desenvolvimento de pesquisas.

Revisão da Literatura

REVISÃO DA LITERATURA

1 Agente Etiológico

Os vírus da Raiva estão inclusos na ordem *Mononegavirales*, família *Rhabdoviridae* e gênero *Lyssavirus*. Os lissavírus reúnem um grupo de quatro sorotipos, distintos em suas características sorológicas e antigênicas, mas igualmente adaptados à replicação no Sistema Nervoso Central de mamíferos (RUPPRECHT, HANLON e HEMACHUDHA, 2002; FOOKS, 2004; CONSALES e BOLZAN, 2007).

A reunião desses exemplares na família *Rhabdoviridae* baseia-se na configuração cônica ou de projétil apresentada por esses vírus e observada em estudos de microscopia eletrônica. Essa família inclui mais de cem vírus de vertebrados distribuídos em seis gêneros: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus*, *Novirhabdovirus*, cujos hospedeiros são animais vertebrados (primordialmente mamíferos e peixes) e *Cytorhabdovirus* e *Nucleorhabdovirus*, identificados em vegetais. Três desses gêneros infectam mamíferos: *Vesiculovirus*, que abrange os vírus da estomatite vesicular; *Lyssavirus*, que engloba os vírus da Raiva e os demais genótipos; e *Ephemerovirus*, vírus da febre efêmera dos bovinos (FENNER et al., 1992; SMITH, 1996; VAN REGENMORTEL et al., 2000; FIELDS, 2001).

Quanto as suas propriedades, vírus da raiva são sensíveis a solventes lipídicos (sabão, éter, clorofórmio e acetona), ao etanol a 45-70%, aos preparados iodados e aos compostos de amônio quaternário. Outras propriedades relevantes são a resistência à dessecação e a procedimentos repetidos de congelação e descongelação, apresentando relativa estabilidade a um pH entre 5-10 e sensibilidade às temperaturas de pasteurização e à luz ultravioleta (MESLIN, KAPLAN, KOPROWSKI, 1996). Sua infecciosidade mantém-se estável em extratos de tecidos submetidos a protocolos de congelação ou liofilização (DULBECCO e GINSBERG, 1980).

De acordo com a Instrução Normativa nº 7 da CTNBio – D.O.U. de 10 de junho de 1997, vírus da Raiva, incluindo todas as suas cepas, são classificados como patógenos com Classe de Risco 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A Classe de Risco 2 é definida pelo moderado risco individual e limitado risco à comunidade. Essa categoria inclui os agentes capazes de causar doença ao homem ou animais, mas que, contudo, não apresentam riscos sérios para os profissionais de laboratório, à comunidade, aos animais e/ou ao meio ambiente,

sendo requerido o Nível de Biosegurança 2 (NB-2) para o trabalho com esses microorganismos (CTBio – FIOCRUZ, 2005).

2 Classificação Genotípica e Filogenética

A cepa clássica de vírus da Raiva é considerada o arquétipo do gênero *Lyssavirus* (FOOKS, 2004), ou seja, é tido como o padrão original ou modelo universalizado da doença, bem como, de sua representação e impacto no inconsciente coletivo. Na verdade, até o incremento de técnicas capazes de revelar sua diversidade em genótipos, a Raiva permaneceu sendo atribuída à manifestação de um único exemplar viral (RUPPRECHT, HANLON e HEMACHUDHA, 2002).

O desenvolvimento de painéis de anticorpos monoclonais anti-nucleocapsídeo (nAbs), empregados em análises sorológicas para a detecção de antígenos virais, possibilitou a classificação dos lissavírus em quatro sorotipos distintos. Com o incremento das técnicas moleculares, o gênero *Lyssavirus* foi diferenciado em sete linhagens geneticamente divergentes denominadas genótipos. Mais recentemente, determinou-se a sub-divisão dos genótipos em dois filogrupos (BADRANE et al., 2001; FOOKS, 2004; SCHNELL et al., 2010).

O gênero *Lyssavirus* é classificado em quatro sorotipos e sete genótipos: o **sorotipo 1** compreende o vírus da Raiva tipo “clássico” (de rua) e suas cepas vacinais. Os demais representantes do gênero *Lyssavirus* são o vírus *Lagos Bat* (LBV, **sorotipo 2**/genótipo 2), o vírus *Mokola* (MOKV, **sorotipo 3**/genótipo 3), o vírus *Duvenhage* (DUVV, **sorotipo 4**/genótipo 4), o *European Bat Lyssavirus 1* (EBLV-1, **sorotipo 4**/genótipo 5), o *European Bat Lyssavirus 2* (EBLV-2, **sorotipo 4**/genótipo 6) e o *Australian Bat Lyssavirus* (ABLV, **sorotipo 1**/genótipo 7) (TORDO, 1996; BLACK et al., 2000; FOOKS, 2004) (Fig.1).

Os sorotipos e os genótipos desses vírus compartilham um alto grau de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, apesar disso, acarretam o desenvolvimento de manifestações clínicas diferentes da encefalite manifesta pelas cepas de vírus clássicos da Raiva. A identificação específica de cada um somente é realizada com o emprego de painéis de anticorpos monoclonais, do teste de neutralização com soro vírus-específico e pela tipificação genética (SMITH, 1996; BLACK et al., 2000).

SOROTIPO	AMOSTRAS
1	RABV, ABLV
2	LBV
3	MOKV
4	DUVV, EBLV-1 e EBL-2
GENÓTIPO	AMOSTRAS
1	RABV
2	LBV
3	MOKV
4	DUVV
5	EBLV-1 a
	ELBV-1 b
6	EBLV-2
7	ABLV

Fonte: adaptado de FOOKS (2004)

Figura 1. Apresentação dos sorotipos e genótipos dos vírus pertencentes ao gênero *Lyssavirus*.

Quanto à distribuição mundial dos genótipos, observa-se que o **genótipo 1** (*vírus clássico da Raiva*) é cosmopolita. O vírus *Lagos Bat* (**genótipo 2**), o vírus *Mokola* (**genótipo 3**) e o vírus *Duvenhage* (**genótipo 4**) parecem ter a sua distribuição restrita à África, enquanto o vírus *European Bat Lyssavirus 1* (EBLV-1, **genótipo 5**) e o vírus *European Bat Lyssavirus 2* (EBLV-2, **genótipo 6**) têm sido encontrados apenas na Europa. Todos os genótipos, com exceção do *Lagos bat* vírus, podem causar encefalopatia em humanos (BLACK et al., 2000).

A execução de análises recentes em nucleotídeos e aminoácidos da região da nucleoproteína (N) de vírus *European Bat Lyssavirus 1* indicou a existência de duas linhagens filogenéticas distintas, *a* e *b*. O EBLV-1 a e o EBLV-1 b são freqüentemente isolados e possuem ampla distribuição. Os vírus EBLV-1 foram isolados primeiramente em morcegos do gênero *Eptesicus sp.*, enquanto os EBLV-2 têm sido identificados apenas em *Myotis sp.* (BLACK et al., 2000).

Com relação ao **genótipo 7**, a realização de comparações genéticas com os demais genótipos (quanto a nucleoproteína - N, a fosforoproteína - P, a proteína matriz - M e a glicoproteína - G), demonstrou que os vírus *Australian Bat Lyssavirus* (ABLV) guardam maior relação com **genótipo 1** (*vírus clássico da Raiva*), do que com os outros membros do gênero *Lyssavirus*. Quanto ao percentual de similaridade entre as proteínas do ABLV com a cepa vacinal Pasteur, observou-se uma similaridade de: 92% para a proteína N, 75% para a proteína P, 87% para a proteína M e 75% para a proteína G. A análise filogenética das

seqüências do gene que codifica a nucleoproteína confirmou que o ABLV era um novo genótipo (genótipo 7), no gênero *Lyssavirus* (GOULD et al., 1998).

Quanto aos hospedeiros, definiu-se que *vírus clássicos da Raiva (genótipo 1)* infectam mamíferos terrestres e morcegos nas Américas; vírus *Lagos bat (genótipo 2)* foram isolados pela primeira vez de um morcego na África, em 1956; vírus *Mokola (genótipo 3)* foram identificados em mussaranhos (*Crocidura sp.*), humanos e felinos do continente africano, mais especificamente, na Etiópia, Nigéria e Zimbábue (SHOPE et al., 1970); vírus *Duvenhage (genótipo 4)* foram isolados de humanos e, posteriormente, de morcegos insetívoros da África do Sul e Zimbábue (BOURHY et al., 1993); vírus *European bat Lyssavirus 1 (genótipo 5)* foram encontrados em um caso de Raiva humana na Rússia e em morcegos insetívoros na Europa; vírus *European bat Lyssavirus 2 (genótipo 6)* foram localizados a partir de um caso humano na Finlândia e de morcegos insetívoros (BRASS, 1994); enquanto vírus *Australian bat Lyssavirus (genótipo 7)* foram descobertos na década de 90 em morcegos frugívoros da Austrália (*Pteropus alecto*, conhecidos popularmente como raposas voadoras) (FRASER et al., 1996).

Após a descoberta do vírus *Lagos bat* e do vírus *Mokola*, a África foi considerada o local de origem do gênero *Lyssavirus* e os quirópteros, a primeira ordem de mamíferos afetada pela rota de evolução dos *Rhabdovirus* (KUZMIN et al., 2005).

Recentemente, quatro lissavírus “divergentes” foram isolados de morcegos insetívoros: vírus *Aravan*, do morcego *Myotis blyti*, no Kirguistão - Ásia Central (ARAI et al., 2003); vírus *Khujand*, do morcego *Myotis mystacinus*, no Tadjiquistão - Ásia Central (KUZMIN et al., 2003); vírus *Irkut*, do morcego *Murina leucogaster*, em Irkutsk - Rússia; e *West Caucasian bat*, de morcegos *Miniopterus schreibersi*, nas cordilheiras do Cáucaso - na fronteira da Ásia com a Europa (WUNNER, 2002).

Esses sete genótipos foram agrupados em dois filogrupos: o **FILOGRUPPO I**, que inclui os genótipos 1, 4, 5, 6, e 7; e o **FILOGRUPPO II**, com os genótipos 2 e 3. Adicionalmente, os isolados mais recentes, ainda não classificados em genótipos, também foram agrupados em filogrupos. Os vírus *Aravan*, *Khujand* e *Irkut* no **FILOGRUPPO I** e o *West Caucasian bat* no **FILOGRUPPO II**. É importante frisar que os vírus do filogrupo I, quando inoculados em camundongos, provocam sinais peculiares da Raiva, enquanto os vírus do filogrupo II não induzem o desenvolvimento de sinais característicos (BADRANE et al., 2001).

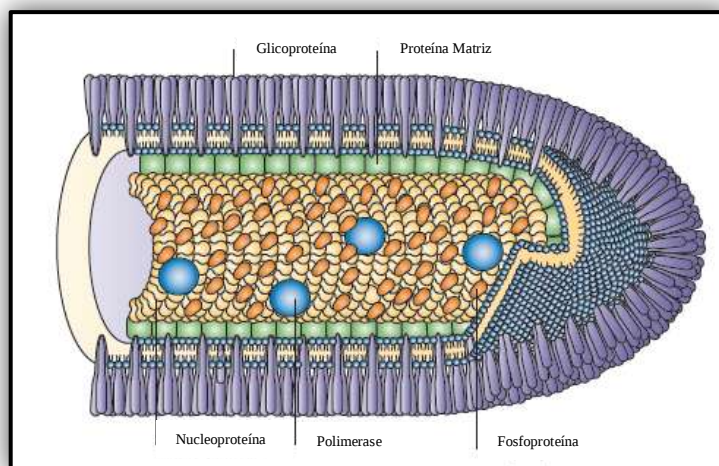
3 Padrões Morfogenéticos

O vírus da Raiva é considerado o protótipo dos vírus neurotrópicos. Cada partícula viral ou vírion apresenta uma morfologia baciliforme de contorno cilíndrico, sendo uma extremidade arredondada e a outra plana (configuração semelhante a um projétil de arma de fogo) e diâmetro de 75 nm (60 a 110 nm) e 180 nm (100 a 300 nm) de comprimento. Seu genoma é formado por um pequeno ácido ribonucleico (RNA) cujo tamanho varia de 11 a 15 Kb (aproximadamente 12.000 nucleotídeos), de fita simples, linear e não-segmentada, de polaridade negativa (3' - 5') complementar ao RNA mensageiro, o que inviabiliza a tradução direta das proteínas (FENNER, et al., 1992; TORDO, 1996; SCHNELL, 2010).

Os lissavírus, como outros rabdovírus, consistem essencialmente de RNA (2% a 3%), proteína (65% a 75%), lipídio (15% a 25%) e carboidrato (3%). O RNA genômico é transcrito em cinco RNAs mensageiros, os quais são traduzidos em proteínas: uma RNA-polimerase RNA dependente (**proteína L** - 2.114 aminoácidos e PM 190 kDa), uma glicoproteína de superfície simples (**proteína G** - 524 aminoácidos e PM 65 a 80 kDa), uma nucleoproteína (**proteína N** - 450 aminoácidos e PM 58 a 62 kDa), uma fosfoproteína (**proteína P** - 297 aminoácidos e PM 35 a 40 kDa) e uma proteína matriz (**proteína M** - 202 aminoácidos e PM 22 a 25 kDa) (FRANCKI et al., 1991; BOURHY e SUREAU, 1991; SMITH, 1996; TORDO, 1996; MESLIN, 1996; VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Em linhas gerais, as nucleoproteína (N), a fosfoproteína (P) e a polimerase (L) compõem o complexo ribonucleoproteína (RNP) junto com o RNA genômico que permanece firmemente associado à nucleoproteína. A nucleoproteína unida ao RNA viral constitui um molde funcional à transcrição e replicação, enquanto a fosfoproteína e a polimerase são responsáveis por atividades enzimáticas. A proteína matriz, por sua vez, localiza-se na superfície interna do envelope e está envolvida na montagem da progênie de vírions. A glicoproteína apresenta-se ancorada no envelope e participa da ligação com os receptores da célula hospedeira e fusão da membrana (SHIMIZU et al., 2007) (Fig.2).

A partícula infecciosa é composta por um envoltório externo, formado por uma dupla **membrana fosfolipídica** (membrana bilaminada derivada da célula hospedeira) e que interage com duas proteínas virais, a glicoproteína e a proteína da matriz. Ela recobre toda a partícula, com exceção da base plana, onde o virion sofre, frequentemente, invaginação formando um canal axial. Da membrana emergem projeções para a superfície semelhantes a espículas, constituídas por glicoproteínas virais (6 a 7 nm de comprimento) (SCHNEIDER e DIRINGER, 1976; VAN REGENMORTEL et al., 2000).



(Fonte: Schnell, 2010)

Figura 2. Estrutura do vírus da Raiva.

A **proteína matriz** (M), a nível estrutural, funciona como uma ponte entre o complexo ribonucleoproteína (RNP) e a membrana viral, localiza-se na face interna do envelope lipídico. A proteína M interage com a RNP e se condensa, mantendo a ligação entre o envelope e o complexo RNP, bem como, conferindo ao vírion a forma helicoidal típica. Apresenta importante papel na regulação da replicação viral (SOKOL; STANCEK e KOPROWSKI, 1971; DELAGNEAU, PERRIN e ATANASIU, 1981; TORDO et al., 1986; SCHNELL, 2010).

A **glicoproteína** (G) é uma proteína transmembranar na forma de espículas que se projetam na superfície viral. É responsável pela ligação do vírus à superfície celular do hospedeiro definindo, desta forma, o neurotropismo do vírus pela interação com os receptores da célula na adsorção. É considerada a única proteína capaz de induzir a formação com os anticorpos neutralizantes. O domínio extracitoplasmático da proteína é a porção mais imunogênica. Variações na sequência de aminoácidos, em algumas regiões da proteína G podem alterar as propriedades patogênicas e imunológicas do vírus. É o alvo das células T-auxiliares e das células citotóxicas específicas (KAPLAN; TURNER e WARREL, 1986; BUNSCHOTEN et al., 1989; WUNNER, 1991; KAWAI e MORIMOTO, 1994; VAN REGENMORTEL et al, 2000; WUNNER, 2002).

A **fosfoproteína** (P) é uma proteína interna, não estrutural (NS) e tem como papel prevenir a fosforilação da nucleoproteína, funcionando como uma dama de companhia capaz de reduzir ligações não específicas, ao manter-se ligada a proteína N promove uma mudança

conformacional que impede sua fosforilação (DELAGNEAU; PERRIN e ATANASIU, 1981; TORDO et al., 1996, SCHNELL, 2010).

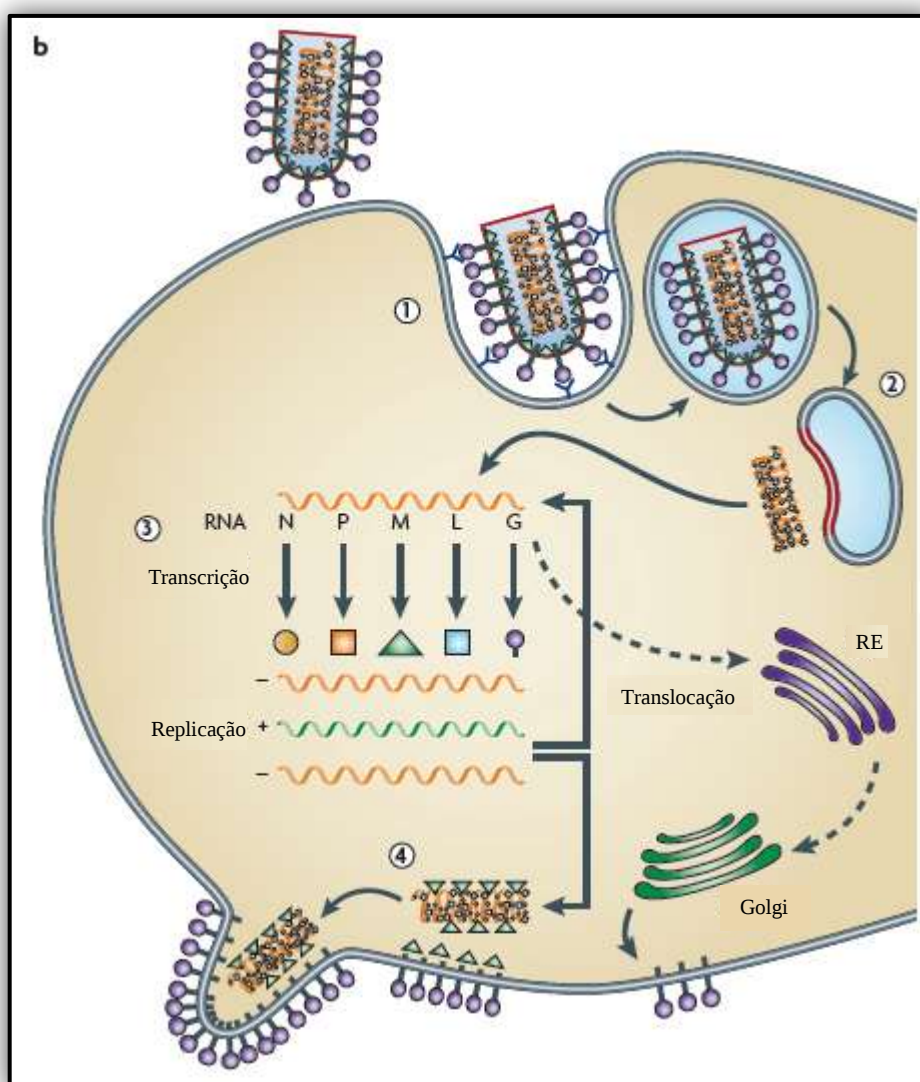
A **RNA polimerase** (L), maior proteína do vírion, é responsável por atividades enzimáticas indispensáveis à transcrição e replicação do RNA viral (TORDO et al., 1988).

A **núcleoproteína** (N) é um polipeptídeo longo, situada no interior do cilindro helicoidal do nucleocapsídeo e fosforilada no resíduo de serina na posição 389. Tem importância estrutural na capsidização do RNA genômico, além de estar envolvido nas etapas de transcrição e replicação, que não se iniciam sem que uma quantidade suficiente de proteína N esteja unida ao RNA genômico. A nucleoproteína é considerada uma região gênica muito conservada, facilitando o desenho de iniciadores hábeis na amplificação de inúmeras variantes virais. Além disso, é um antígeno grupo-específico por apresentar uma pequena diversidade de sequência de aminoácidos entre os genótipos (KISSI, TORDO e BOURHY, 1995; TORDO, 1996; CREPIN, AUDRY e ROTIVEL, 1998; VAN REGENMORTEL et al., 2000).

4 Ciclo Infeccioso e Potencial Replicativo

A transmissão de vírus da Raiva ocorre, comumente, por contato direto em episódios de mordeduras e exposição de mucosas e/ou pele lesionada à saliva de um animal infectado. O período de incubação varia entre três e doze semanas, podendo chegar a anos. O vírus pode alcançar diretamente as terminações nervosas sensoriais e/ou motoras, ou permanecer nas células musculares estriadas, onde acontece a amplificação viral, que propiciará a infecção dos nervos periféricos. O genoma viral é transportado no interior do axoplasma dos neurônios, centripetamente, provocando, em seguida, um quadro clínico característico de encefalomielite aguda (COSTA et al., 2000; XAVIER, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; PARK et al, 2006; ZACHARY, 2007).

Quando um vírion da família *Rhabdoviridae* encontra uma célula hospedeira susceptível, uma série de eventos é desencadeada, podendo-se classificá-los como: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem e brotamento. Tais eventos resultam na liberação da progênie viral (WAGNER e ROSE, 1996) (Fig.3).



(Fonte: Schnell, 2010)

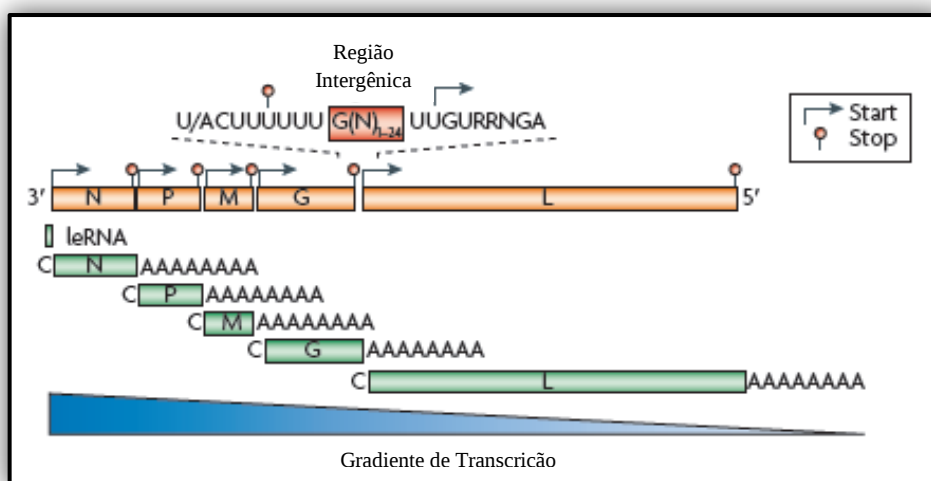
Figura 3. Ciclo viral na célula hospedeira.

Com a fusão do envelope do vírus à membrana da célula hospedeira pelo processo de adsorção, inicia-se a infecção. Após a **ligação do virion à célula hospedeira**¹, pela interação da proteína G com os receptores específicos da superfície, este é englobado pela célula por endocitose. O genoma viral é liberado no citoplasma por fusão de membranas mediada pela glicoproteína dependente de pH (6,3), o que implica em discretas mudanças conformacionais na glicoproteína. Os agregados de vírions permanecem em **endossomas**² até que as membranas virais fundem-se à membrana endossomal, liberando a RNP viral no citoplasma. Inicia-se, então, a transcrição do RNA viral (GAUDIN et al., 1993).

À semelhança dos demais vírus RNA de fita simples negativa e não segmentada, o **genoma do vírus da Raiva é transcrito**³ para uma configuração positiva monocistrônica, ou

seja, na qual cada um dos cinco RNA mensageiros (mRNA) é transcrito separadamente após síntese do genoma complementar, de fita positiva (5'-3'). A transcrição preliminar, pelo complexo da transcriptase do vírus, produz cinco espécies de mRNA na ordem N, P, M, G, e L. Cada um destes é 5' polarizado e 3' poliadenilado pela enzima codificada pela proteína L. Os genes que codificam as cinco proteínas estruturais – N (1350nt), P (891nt), M (606nt), G (1572 nt) e L (6424nt) – apresentam-se separados por pequenas regiões intergênicas de 2, 2, 5 e 24 nucleotídeos, respectivamente (SCHNEIDER e DIRINGER, 1976; TORDO et al., 1986; BOURHY e SUREAU, 1991; MURPHY, 1996) (Fig.3).

A **tradução**, por sua vez, envolve a síntese das proteínas virais. Contudo, embora a síntese da proteína G seja iniciada nos ribossomos livres, a terminação e glicosilação ocorrem no retículo endoplasmático (RE) e no aparelho de Golgi (translocação). O genoma completo é replicado e essas fitas positivas do RNA servem como moldes para a síntese das fitas negativas do genoma viral. Vale destacar que a morfogênese dos vírus da Raiva é análoga tanto *in vivo* quanto em *in vitro* e é caracterizada por dois eventos: formação da matriz na configuração de uma massa não organizada de fitas de proteínas do ribonucleocapsídeo e do envelope viral que acontece durante o brotamento na membrana plasmática (SCHNEIDER e DIRINGER, 1976; TORDO et al., 1986; BOURHY e SUREAU, 1991; MURPHY, 1996) (Fig.3).



(Fonte: Schnell, 2010)

Figura 4. Transcrição do genoma do vírus da Raiva.

A **montagem do virion**⁴ está associada com a presença da proteína matriz, o que determina a gênese do corpúsculo de inclusão. O desenvolvimento da matriz no interior do

citoplasma de células infectadas produz uma estrutura homogênea fora dos limites dos componentes celulares, substituindo-os. A fita de ribonucleoproteínas, inicialmente parecendo um fino filamento, vai gradualmente se tornando mais espessa. A formação do vírion precede uma maior aproximação desses filamentos aos agregados ribossômicos. O complexo protéico N-P-L encapsula o RNA genômico formando RNP e a proteína de M forma a matriz em torno do RNP. O complexo de RNP-M migra para áreas periféricas junto à membrana plasmática da célula que contêm inserções de glicoproteínas. O complexo de RNP-M liga-se com as glicoproteínas e o vírus terminado brota da membrana. Em contraste com as infecções causadas por cepas do vírus de rua, as infecções por vírus fixo raramente exibem partículas virais no interior da matriz, apesar dos altos títulos encontrados tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Esse comportamento pode sugerir um processo distinto de maturação, sendo empregado na distinção de amostras selvagens e fixas (SCHNEIDER e DIRINGER, 1976; CDC, 2006; SCHNELL, 2010).

Vale salientar que o rendimento da replicação viral é muito baixo. Um quantitativo limitado de vírions sofre brotamento, levando-se em conta a considerável produção de nucleocapsídeos virais. Na verdade, essas estruturas acumulam-se no citoplasma das células infectadas na forma de inclusões detectáveis pelas técnicas histológicas, de imunofluorescência, bem como, por microscopia eletrônica (BOURHY e SUREAU, 1991).

5 Bases da Patogênese por Vírus da Raiva

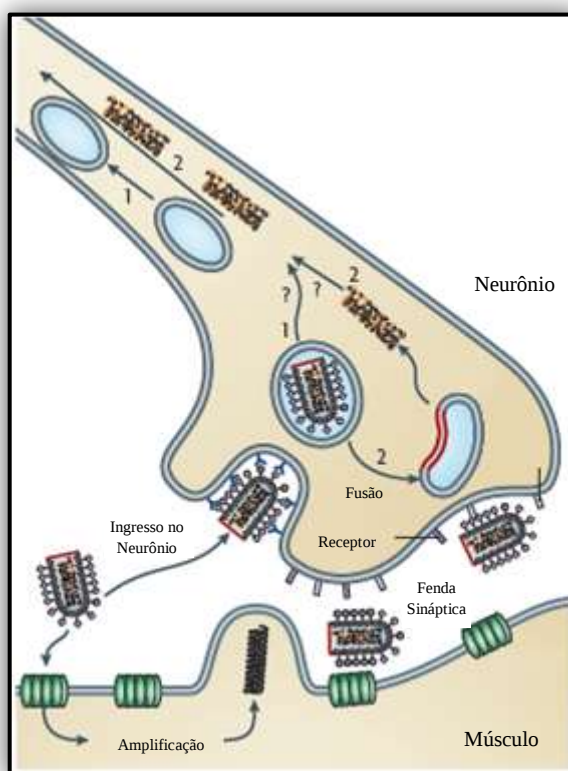
Após inoculação intramuscular, as partículas do vírus da Raiva, provavelmente, são replicadas nas células musculares estriadas e do tecido subepitelial até que atinjam concentrações suficientes para sofrerem dispersão, posteriormente, nas terminações nervosas sem mielina dos nervos motores e disseminam-se pelos nervos periféricos de forma ascendente, a infecção neuronal e o movimento passivo centrípeto dentro do axônio levam ao envolvimento do SNC (DULBECCO e GINSBERG, 1980; LENTZ et al., 1982; TSIANG, 1988; TSIANG et al. 1991; FENNER et al., 1993; JACOB et al., 2000; HEMACHUDHA et al., 2002).

As partículas de vírus da Raiva têm aptidão para se ligar aos receptores nicotínicos de acetilcolina na junção neuromuscular (BAER, 1972; LENTZ e SMITH, 1982; REAGAN et al., 1985; WHITE e FENNER, 1994; PRESCOTT et al., 1996; COLLIER e OXFORD, 2000; TYLER e NATHANSON, 2001) (Fig.5). Alguns autores observaram outros

possíveis receptores para o vírus, como o ácido siálico de gangliosídeos e as moléculas neurais de adesão celular (THOULOZE et al., 1998), bem como o receptor de neurotrofinas P75NTR (TUFFEREAU et al., 1998).

Os vírus são conduzidos em direção ao sistema nervoso central (SNC) através de axônios tanto motores quanto sensoriais, mediante transporte axonal retrógrado a uma taxa de deslocamento compreendida entre 12 e 100 milímetros por dia (LYCKE e TSIANG, 1987, TSIANG et al, 1991). O transporte axonal retrógrado, como sentido peculiar à propagação de vírus da Raiva, foi confirmado pelo emprego desses vírus como marcadores neuroanatômicos na determinação dos circuitos sinápticos dos neurônios de roedores e primatas (KELLY e STRICK, 2000; SCHNELL et al., 2010).

A partir do momento que os neurônios encontram-se infectados, tem início a propagação viral neurônio a neurônio no interior dos axônios e ao longo das conexões neuroanatômicas. Muitos tipos de células nervosas são infectadas, contudo, a infecção de células não neuronais é menos freqüente. A replicação do vírus da Raiva *in vivo* é quase que inteiramente adstrita ao tecido nervoso, sendo o neurotropismo a principal característica da infecção por esse vírus (DIETZSCHOLD et al., 1985).



(Fonte: Schnell, 2010)

Figura 5. Transporte intraneuronal do vírus da Raiva.

A partir do SNC, os vírus são disseminados pela rota centrífuga, através dos nervos periféricos, em direção a diversos órgãos. O deslocamento ao longo das vias neuronais ocorre, em particular, pelo envolvimento do sistema nervoso parassimpático, sendo responsável pela infecção das glândulas salivares, a pele, coração e uma variedade de outros órgãos. Antígenos virais já foram detectados em células da epiderme, folículos pilosos, retina, córnea, glândulas lacrimais, glândulas salivares, pulmão, músculo cardíaco, mucosas gástrica e intestinal, pâncreas, parênquima renal, glândulas adrenais, ureteres, bexiga e uretra (CHARLTON, 1988; GERMANO et al., 1988; LARGHI e OUBINA, 1998).

Deve-se destacar que o período de incubação depende, principalmente, do volume do inóculo viral e da distância do trajeto entre o ferimento e o cérebro. Sua extensão está relacionada com a gravidade e o tamanho da ferida causada pelo animal infectado e é menor em mordidas na face e na cabeça (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Na resposta imune, a apresentação dos antígenos pelos macrófagos é crucial para a produção de anticorpos pelos linfócitos B e para a estimulação de linfócitos T-auxiliares que, por sua vez, produzirão as citocinas envolvidas na eliminação dos vírus. Entretanto, na infecção por vírus da Raiva, a estimulação de linfócitos B e a síntese de imunoglobulinas, geralmente, não ocorrem até os sinais clínicos aparecerem e o título de anticorpos neutralizantes permanece baixo até a fase terminal da doença, atingindo seu pico próximo da morte do hospedeiro (ZANETTI, 1998). Embora as proteínas de vírus da Raiva sejam altamente imunogênicas, a resposta imune contra o vírus é fraca durante a fase ascendente, desde o local de entrada até o SNC, fato que pode ser atribuído à barreira hematoencefálica, que mantém o vírus isolado dos anticorpos e células imunes (GONÇALVES et al., 2002).

As mudanças neuropatológicas no SNC decorrentes de infecções naturais são relativamente discretas, consistindo em um processo inflamatório leve e degeneração neuronal pouco acentuada. Essa particularidade tem apoiado o conceito de que a disfunção neuronal desempenha um papel mais importante na produção da doença do que a morte celular. Uma variedade de estudos experimentais tem investigado a ocorrência de possíveis alterações na neurotransmissão decorrentes da infecção por vírus da Raiva, contudo, anormalidades de significado incerto foram encontradas, mas nenhum defeito fundamental demonstrado explica a disfunção neuronal na Raiva (CECCALDI et al., 1993; DUMRONGPHOL et al., 1996).

Tem sido demonstrado que vírus neurotrópicos podem ocasionar a morte celular por apoptose ou necrose (ALLSOPP e FAZAKERLEY, 2000; FAZAKERLEY e ALLSOPP, 2001). A ocorrência de apoptose depende da síntese de macromoléculas e requer energia para a sua execução, enquanto a necrose está associada um processo desordenado motivado por

fatores patológicos que levam à lesão celular irreversível. Vírus modificados são fortes indutores de apoptose neuronal em culturas primárias de neurônios e, também, em camundongos após inoculação periférica, quando comparados com cepas mais virulentas. Em geral, a apoptose é um mecanismo do hospedeiro utilizado para limitar a disseminação viral e não desempenham um papel fundamental na patogênese da doença. Não obstante, as bases para a disfunção neuronal na Raiva são mais complexas e podem abranger alterações degenerativas concernentes aos processos neuronais de condução (JACKSON, 2004; SCHNELL, 2010).

A maioria das evidências indica, portanto, que as cepas patogênicas de vírus da Raiva não induzem apoptose e que a tendência de algumas cepas promoverem apoptose reduz significativamente o seu potencial patogênico. A competência para induzir apoptose depende em grande parte dos níveis de expressão e da sequência de aminoácidos da glicoproteína da partícula do vírus da Raiva. Esse fato pode explicar porque a ocorrência de apoptose é mais detectada durante infecções por cepas extremamente atenuadas, que se caracterizam pela expressão de altos níveis de proteínas virais quando comparadas a cepas patogênicas. Contudo, permanece obscuro o mecanismo pelo qual as cepas patogênicas evitam a instalação de apoptose (PREHAUD et al., 2003; THOULOZE et al., 2003).

6 Conservação de Amostras de Vírus da Raiva

Os protocolos empregados na conservação de amostras de vírus da Raiva têm sido descritos de forma sucinta na literatura científica, sendo que a maioria das pesquisas dedicadas a esse campo de estudo tem como foco a investigação e o aprimoramento do diagnóstico viral em amostras submetidas à decomposição (VALENTINI et al., 1991, ALBAS et al., 1999; DAVID et al, 2002; BISWAL et al., 2007; ARAÚJO et al, 2008; LOPES et al., 2010).

Em seu estudo, Valentini et al. (1991) verificaram experimentalmente o efeito do estado de conservação das carcaças de camundongos infectados por vírus da Raiva e a sua possível interferência na prova de imunofluorescência direta (IFD). Os camundongos mortos após a inoculação do vírus rábico eram submetidos a diferentes condições de conservação (tempo e temperatura), subseqüentemente, os cérebros desses animais eram avaliados pela IFD, na tentativa de se estabelecer o momento em que a prova deixa de ser eficaz, em consequência à decomposição tissular.

Assim, os autores evidenciaram que apesar de ostentar uma alta sensibilidade e especificidade, a IFD quando utilizada em materiais em adiantado estado de decomposição pode ter seus resultados comprometidos. Foi observado que quando as carcaças eram mantidas a 4°C, decorridas 72h os resultados da IFD eram negativos em 100% dos materiais examinados. Por outro lado, os cérebros obtidos de carcaças congeladas a -20°C apresentaram-se viáveis à prova, mesmo tendo sido armazenados por 720h (30 dias).

Albas et al. (1999) avaliaram a influência da decomposição de cérebros caninos no diagnóstico laboratorial da Raiva, buscando confirmar o diagnóstico da Raiva e medir o efeito da putrefação na acurácia do teste de IFD e na inoculação intracerebral (IC) em camundongos. Cérebros de cães infectados com o vírus da Raiva foram submetidos à decomposição, à temperatura ambiente de 25 a 29°C por até 168h. Após 48h do início do experimento, o teste de IC começou a ser prejudicado, detectando-se resultados falso-negativos; decorridas 72h, os autores comprovaram a ocorrência de falso-negativos tanto na IC quanto na IFD. Concluiu-se que o período limite para o estabelecimento de um diagnóstico seguro deve ser de 24 e 48h antes da putrefação se instalar.

Por sua vez, David et al. (2002) chamam a atenção para o número significativo de amostras em estado de decomposição submetidas anualmente para a avaliação diagnóstica, assinalando esse tipo de ocorrência como fator de risco para o incremento de resultados falso-negativos pelo teste de IFD. Com base nessa evidência, os autores utilizaram a técnica de reação em cadeia pela polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) para detectar vírus da Raiva em cérebros naturalmente infectados em estado de decomposição. Demonstrou-se que, de 219 amostras em decomposição submetidas para diagnóstico, 10 espécimes mostraram-se negativos para IFD e positivos para RT-PCR, destas apenas três foram identificadas pelo isolamento em cultura de células e pela IC em camundongos.

Araújo et al. (2008) avaliaram, mediante a aplicação de técnicas moleculares, amostras cerebrais de distintas espécies animais que foram armazenadas a -20°C por diferentes períodos (até 7 anos), descongeladas e submetidas a decomposição. Os autores concluíram que a utilização de amostras em decomposição diminui a sensibilidade na aplicação das técnicas moleculares para a detecção de vírus da Raiva, destacando que as condições não ideais de armazenamento devem ser consideradas na interpretação dos resultados encontrados.

Por outro lado, Lopes et al. (2010) analisaram amostras positivas para vírus da Raiva, num estado visível de decomposição, estocadas sobre condições de congelamento por longos períodos de tempo (algumas com mais de 10 anos), através de técnicas moleculares e

isolamento viral. A taxa de amostras viáveis pela técnica de inoculação em camundongos foi de 33,6%, não havendo, contudo, correlação entre o tempo de estocagem e a viabilidade viral. Esse estudo confirma a sensibilidade da RT-PCR na detecção do genoma do vírus da Raiva em amostras submetidas a diferentes condições de conservação, incluindo aquelas em estado de decomposição.

Segundo Valentini et al. (1991), os laboratórios que oferecem serviços de diagnóstico para Raiva, freqüentemente recebem materiais suspeitos que são muitas vezes mantidos em condições inadequadas de conservação. A ocorrência de amostras em decomposição, decorrente de falhas na execução dos procedimentos de coleta, acondicionamento, transporte e/ou conservação, deve ser considerada, visto que vários autores comprovaram que o início do processo de decomposição das amostras marca o declínio gradativo da sensibilidade dos testes diagnósticos para os vírus da Raiva.

Justificativa

JUSTIFICATIVA

A construção do conhecimento humano acerca dos vírus da Raiva tem sido edificada durante séculos, contudo, não foi suficiente para garantir a erradicação da doença ou sua cura definitiva. Da mesma forma, muitas perguntas a respeito da doença permanecem sem respostas até os dias de hoje.

Nesse sentido, o incremento de protocolos mais eficientes de conservação de amostras de vírus da Raiva poderia assegurar, sobremaneira, a continuidade e expansão de pesquisas nessa área, dando vazão ao incremento de estudos capazes de superar barreiras cronológicas e geográficas e, por conseguinte, elucidar alguns mistérios dessa doença milenar.

Cabe destacar que entre as razões que motivam a preservação de estoques microbiológicos destaca-se a possibilidade de se viabilizar a apreciação de exemplares estocados por tecnologias futuras ou, simplesmente, permitir a análise de amostras ‘antigas’ quando novos questionamentos emergirem (PAOLI, 2005).

Além disso, em muitas situações de pesquisa, é comum que as oportunidades de acesso às amostras sejam limitadas e susceptíveis a mudanças de condições capazes de inviabilizar definitivamente a obtenção das mesmas. Por conseguinte, é imprescindível a manipulação e armazenamento cuidadosos, empregando-se técnicas e protocolos que tenham sido validados *a priori*, pois o processo de estocagem, em si, pode afetar a qualidade dos exemplares e definir sua perspectiva de uso posterior. Desse modo, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes (HOLLAND et al., 2003).

Não obstante a significativa importância da estocagem microbiológica, há uma lacuna em termos de publicações científicas pertinentes à conservação de amostras de vírus da Raiva, observando-se um número reduzido de trabalhos produzidos em torno da problemática e com ênfase no estudo de amostras submetidas à decomposição, o que evidencia o potencial para o desenvolvimento de pesquisas nessa área.

Hipótesis Científicas

HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A criopreservação a -20°C é uma técnica eficaz para a conservação da viabilidade viral de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso por um período de 30 dias (conservação a curto-prazo);
- O uso de crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido e glicerol) e não penetrantes (sacarose e polietilenoglicol) possibilitam uma melhor criopreservação das amostras do vírus da Raiva a uma temperatura de -20°C .

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar diferentes protocolos de criopreservação a -20°C em amostras de vírus da Raiva.

Objetivos específicos

- Averiguar os métodos de criopreservação empregados na conservação de amostras de vírus da Raiva nos principais serviços especializados do País;
- Identificar os efeitos da criopreservação a -20°C sobre a viabilidade viral de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso por um período de 30 dias (conservação a curto-prazo), pelo isolamento viral, titulação e teste de imunofluorescência direta;
- Avaliar a pertinência do uso de crioprotetores penetrantes (dimetilsulfóxido e glicerol) e não penetrantes (sacarose e polietilenoglicol) na criopreservação de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso a uma temperatura de -20°C .

Capítulo I

CAPÍTULO I

TÍTULO DO ARTIGO

Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas

(Microbiological samples storage and preservation principles)

Edmara Chaves COSTA^{1*}, Maria Fátima da Silva TEIXEIRA¹, Tânia Valeska Medeiros DANTAS¹,
Valeska Shelda Pessoa de MELO¹, Suzana Aparecida Costa ARAÚJO¹, Benedito Neilson ROLIM¹

Endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores

^{1*} Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Virologia, Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br

RESUMO

Atualmente, centenas de milhares de amostras das mais variadas origens, incluindo células humanas, animais ou bacterianas, além de vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), são armazenadas a cada ano com propósitos diagnósticos e de pesquisa, abrangendo aplicações tanto em laboratórios médicos quanto em veterinários. Contudo, não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de microorganismos a longo-prazo. A eleição do procedimento mais adequado à conservação de amostras deve, portanto, ser norteadas pelas características do espécime em estudo, bem como pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis. Muitas células, tecidos e microrganismos, para os quais há uma crescente demanda, ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, fazendo da criobiologia um campo de vasto potencial para o desenvolvimento de pesquisas. Assim, a proposta dessa revisão é a de discutir os princípios que norteiam o processo de coleta, processamento, estocagem e preservação de material microbiológico, tomado como base estudos disponíveis na literatura científica contemporânea.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação, Estocagem, Amostras microbiológicas

Periódico: Ciência Animal (Aceito para publicação em junho de 2010)

ABSTRACT

In the last years, hundreds of thousands of samples of the more varied origins, including animal, human or bacterium cells, besides virus, fungi and genetic stuff (DNA/RNA), have been stored to each year for diagnoses and research purposes, with application in medical and veterinarian laboratories. However, not a singular, ideal or universal method exists to decide the efficiency of the long-term microorganisms stock and preservation. Therefore, the election of an adequate procedure to the conservation of samples should be guided by the characteristics of the specimen in study, as well as, by the advantages and disadvantages of the available techniques. Many cells, tissues and microorganisms for which there is a growing demand still wait for the development of satisfactory methodologies to their conservation, making the cryobiology a field of vast potential for the development of researches. Like this, the proposal of this revision is to discuss the principles that guide the trial of collection, processing, stock and preservation of microbiological stuff, using the available studies in the contemporary scientific literature as base.

KEY-WORDS: Cryopreservation, Storage, Microbiological samples

INTRODUÇÃO

O curso da natureza dita que os materiais biológicos irão degenerar e morrer; assim, a estrutura e função dos organismos mudam e são perdidas com o tempo. O intuito de parar ou pelo menos retardar o relógio biológico tem sido perseguido desde os tempos mais remotos, alcançando-se na contemporaneidade um potencial de estocagem de amostras biológicas a longo-prazo, que surpreende as perspectivas mais otimistas.

Atualmente, centenas de milhares de amostras das mais variadas origens, incluindo células humanas, animais e vegetais, além de bactérias, vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), são armazenadas a cada ano com propósitos diagnósticos e de pesquisa, abrangendo aplicações tanto em laboratórios médicos quanto em veterinários.

As mais importantes razões que motivam a estocagem e preservação de espécimes biológicos são sintetizadas por PAOLI (2005):

- realizar análises epidemiológicas, tomando por base a comparação entre amostras humanas e animais de um mesmo episódio epidêmico; ou de casos ocorridos em diferentes recortes temporais e/ou áreas geográficas. O estoque de amostras oferece a oportunidade, por vezes, única, de se estudar características genéticas de microrganismos, proporcionando o estabelecimento das formas de transmissão em nível local ou mesmo no cenário mundial;
- viabilizar a análise de amostras antigas no momento em que novos questionamentos surgem, patógenos emergem ou reemergem, possibilitando a elaboração tanto de pesquisas

prospectivas quanto retrospectivas. As informações geradas a partir desses estoques são o alicerce para a elaboração de planos de controle de infecções, incluindo o desenvolvimento de vacinas ou de estratégias apropriadas de controle;

- assegurar o progresso dos procedimentos diagnósticos mediante a comparação de amostras oriundas de um mesmo indivíduo em diferentes espaços de tempo ou de sujeitos distintos com doenças similares, além de viabilizar a apreciação das amostras estocadas com métodos analíticos recentes, capazes de incrementar a sensibilidade e a especificidade dos protocolos de detecção de agentes infecciosos;
- desempenhar estudos investigativos, requerendo um grande contingente de amostras coletadas em diferentes localizações geográficas; ou que demandam a análise de múltiplos parâmetros em distintos laboratórios especializados ao redor do mundo;
- funcionar como fonte para a reposição de linhagens de células humanas, animais e vegetais ou de microrganismos usados em procedimentos diagnósticos e em pesquisas, no intuito de instituir programas de controle de qualidade nos laboratórios ou para prover insumos de referência para a pesquisa.

A concretização de trabalhos no campo das ciências biológicas, agrárias, biomédicas e em diversas áreas da indústria e da agropecuária baseia-se, primariamente, na manutenção de amostras biológicas. Assim, o reconhecimento da grande relevância da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano tem conduzido ao aprimoramento de técnicas destinadas à conservação dos mais diversos espécimes microbiológicos. E é graças à emergente importância atribuída à estocagem de amostras que muitas instituições públicas e privadas têm constituído estoques particulares (biobancos), adotando inúmeras técnicas de preservação, com protocolos próprios e avançadas tecnologias no controle de dados (bioinformática) (FIGUEIREDO, 2001; HOLLAND et al., 2003; PAOLI, 2005).

A despeito da importância do tema, observa-se uma lacuna entre as publicações científicas pertinentes, no sentido de que um número significativamente reduzido de estudos tem sido produzido abordando a problemática da seleção e validação de protocolos nessa área, bem como avaliando os desafios e as perspectivas da coleta, processamento e estocagem de amostras em microbiologia.

Nesse sentido, o trabalho de revisão que se segue tem o objetivo de discutir os princípios que norteiam o processo de coleta, processamento, estocagem e preservação de materiais microbiológicos, tomando como base estudos disponíveis na literatura científica contemporânea.

DESENVOLVIMENTO

FUNDAMENTOS DA COLETA E DO PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS

A validação de diretrizes destinadas à coleta de material e avaliação da qualidade das amostras passivas de estocagem é o primeiro passo essencial à constituição de um banco de amostras microbiológicas. A execução de procedimentos adequados de amostragem pode assegurar a correta identificação do material, sua coleta e envio ao serviço de estocagem no sentido de maximizar a recuperação de microrganismos e células quando requisitados.

Os potenciais espécimes de interesse precisam ser definidos antecipadamente à coleta de dados, permitindo o desenvolvimento apropriado de protocolos de coleta e processamento do material e possibilitando a execução de testes pilotos. Dada a variedade de fatores capazes de afetar a qualidade da amostra, a realização preliminar de testes pilotos caracteriza-se como um passo importante no sentido de propiciar melhores condições à coleta dos espécimes, evitando o comprometimento das amostras definitivas e propiciando a confecção de estudos com delineamento de melhor qualidade (HOLLAND et al., 2005).

Para a compilação segura do material biológico, faz-se necessário o estabelecimento de uma comunicação clara entre os pesquisadores e a equipe responsável pela coleta dos espécimes, bem como, a adequação metodológica aos objetivos do estudo. Após a padronização das etapas de coleta, o processamento dos exemplares deve ser otimizado pela efetivação de testes preliminares, propiciando condições ideais à preservação da integridade das amostras. Com esse propósito, devem-se instituir análises comparativas dos diferentes sistemas de preservação ante a viabilidade, patogenicidade, parâmetros morfológicos e fisiológicos e na estabilidade genômica de células e de cepas antes e depois da estocagem (HOLLAND et al., 2005).

No intuito de satisfazer à demanda de futuras pesquisas, uma amostra original pode ser dividida em alíquotas, adequadas a diferentes objetivos e contendo diversas vias iguais do mesmo material (por exemplo, pequenas alíquotas de soro ou de uma cepa bacteriana) e/ou vias contendo diferentes materiais obtidos de uma única amostra (por exemplo, células intactas, DNA e/ou RNA, proteínas entre outros) (CHAPMAN, 2003).

De fato, a maior preocupação quanto aos protocolos de estocagem recai em seus efeitos sobre a estabilidade das amostras. Dentre os fatores conhecidos que influenciam essa estabilidade podem-se destacar: (a) o uso e os tipos de conservantes; (b) as variações de temperatura entre a coleta e o processamento do material, bem como, no decorrer do processo de estocagem; (c) o tempo despendido entre o processamento primário e a estocagem; (d) a

ausência de contaminação por ocasião da coleta e do processamento; (e) a atividade de agentes endógenos de degradação ou de substâncias inibidoras na própria amostra (HOLLAND et al., 2005).

CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS

Em muitas situações de pesquisa é comum que as oportunidades de acesso aos espécimes sejam limitadas e susceptíveis a mudanças de condições capazes de inviabilizar definitivamente a obtenção dos mesmos. É imprescindível, portanto, que essas amostras sejam manipuladas e estocadas cuidadosamente, empregando técnicas e protocolos que tenham sido validados em pré-testes. A estocagem ou composição de bancos de amostras é, em si mesma, um elemento central especialmente para estudos longitudinais (amplo intervalo cronológico) ou para uso em pesquisas futuras. O processo de estocagem pode afetar a qualidade das amostras e determinar sua possibilidade de uso posterior (HOLLAND et al., 2003).

Considerando que a tecnologia de refrigeração promove um significativo retardo nas taxas de deterioração de bens perecíveis, o uso de temperaturas muito mais baixas tem favorecido a estocagem de organismos vivos em estado de animação suspensa por extensos períodos de tempo. A remoção da água de materiais biológicos viáveis em estado de congelamento (liofilização) proporciona outro meio de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza. A criopreservação e a liofilização são as técnicas mais largamente empregadas na conservação da biodiversidade microbiana. Essa é uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas (DAY & MCLELLAN, 1995; MYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005).

Criopreservação

A criopreservação, aspecto aplicado da criobiologia, é o resultado da aplicação de métodos que permitem a manutenção de uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas. Seu objetivo maior é minimizar o dano a materiais biológicos, incluindo tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus durante o processo de congelação e estocagem a frio (WOLFE & BRYANT, 2001).

O princípio da congelação-descongelação se perpetua como procedimento fundamental à preservação celular até o momento. As altas taxas de sobrevivência alcançadas por esse método despertam o interesse tanto do ponto de vista biofísico quanto prático por viabilizar a recuperação de populações celulares íntegras, ou seja, livres de possíveis alterações na sua composição genética. No entanto, a despeito do seu vasto uso, os protocolos

de criopreservação requerem adequação metodológica para cada tipo de microrganismo (DUMONT et al, 2003; 2004).

Uma concepção errônea freqüentemente atribuída à criobiologia tem sido a prerrogativa de que o sucesso dos métodos de criopreservação para uma cepa ou espécie é transferível a células ou a organismos similares. Apesar dessa afirmação ser, por vezes, verdadeira, está longe de ser uma regra. As diferenças biológicas implicam respostas divergentes aos sistemas de congelação e uso de crioprotetores, reforçando a necessidade de tecer ajustes ou mesmo reestruturar os critérios de preservação de acordo com o material sob estudo (DAY & MCLELLAN, 1995).

Uma expressiva variedade de fatores influencia a efetividade da criopreservação de microrganismos com destaque à espécie a qual o exemplar pertence, o tipo cepa, o tamanho e a forma da estrutura celular, a fase e a taxa de desenvolvimento, a temperatura de incubação, a composição do meio de crescimento, o pH, a osmolaridade e aeração, o teor de água da célula, o teor lipídico e a composição do meio de congelação, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de aquecimento e o meio de recuperação (KIRSOP & DOYLE, 1991; DAY & MCLELLAN, 1995).

A criopreservação compreende a estocagem de material a baixas (-20°C a -80°C em freezers) e a ultra-baixas temperaturas (-150°C em containeres de nitrogênio líquido), no último caso o processo ocorre na fase líquida ou de vapor do nitrogênio. Os sistemas de nitrogênio líquido permitem o armazenamento a temperaturas totalmente constantes, enquanto os freezers mecânicos estão sujeitos a variações de temperatura capazes de comprometer a qualidade das amostras estocadas (SU et al., 1996; WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005). Contudo, Vysekantsev et al. (2005) demonstraram que, mesmo em sistemas de criopreservação a temperaturas ultra-baixas, uma mudança cíclica da temperatura de -196°C até -130°C ou -100°C implica morte dos microrganismos armazenados. Fato que deveria ser levado em consideração ante a movimentação e transporte de exemplares criopreservados.

Outro parâmetro de grande relevância para o sucesso em criobiologia diz respeito às taxas de resfriamento. Nos procedimentos de resfriamento lento, o material biológico é submetido ao declínio gradativo da temperatura, obedecendo a uma curva de resfriamento rápida o bastante para prevenir a instalação de danos e suficientemente lenta para permitir um grau de desidratação capaz de evitar a formação de gelo intracelular. A vitrificação, por sua vez, é um processo de criopreservação que utiliza taxas de resfriamento extremamente altas,

no qual o conteúdo de água é reduzido antes do resfriamento pela adição de concentrações intensas de agentes crioprotetores, o que impede a formação de cristais de gelo (PEGG, 2002).

Estudo conduzido por Dumont et al. (2004) analisou a viabilidade de cinco tipos celulares (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e uma célula humana da linhagem leucocitária K562) em função das taxas de resfriamento, durante a criopreservação. Com base nos achados, a viabilidade celular foi classificada em três escalas: alta viabilidade para baixas taxas de resfriamento (5 a 180°C/min), que permite o efluxo do conteúdo de água celular, prevenindo a cristalização intracelular; baixa viabilidade para taxas intermediárias de resfriamento (180 a 5.000°C/min), no qual o fluxo de calor prevalece sobre o efluxo de água, propiciando a ocorrência de cristalização (no momento em que o fluxo de água está se dando para fora da célula); e alta viabilidade para taxas de resfriamento muito altas (>5.000°C/min), capazes de induzir um fluxo de calor tão rápido que a vitrificação intracelular se estabelece antes da ocorrência de qualquer efluxo de água.

Esses resultados ilustram a forte influência da taxa de resfriamento sobre a viabilidade celular. Para todos os tipos celulares investigados, a viabilidade mostrou-se maior nas taxas de resfriamento baixas e muito altas. Esse comportamento é explicado pela competição entre o fluxo de calor e o efluxo de água na célula, durante o processo de congelamento-descongelamento. Nas taxas mais baixas de resfriamento, o calor latente de congelamento da água celular propicia tempo suficiente para a saída da água e previne, por isso, a formação de cristais de gelo no espaço intracelular. As taxas intermediárias de resfriamento implicam um retardo à vitrificação intracelular e se tornam um fator negativo para a viabilidade do espécime, ocorrendo morte celular devido aos danos propiciados pela cristalização durante o efluxo de água pela membrana plasmática. Contudo, esse comportamento geral das células tende a apresentar particularidades de acordo com cada tipo celular, podendo ser influenciado pelo tamanho da célula, pelas características de permeabilidade à água e pela presença de parede celular (DUMONT et al, 2003).

Danos decorrentes do processo de criopreservação

Deve-se chamar a atenção ao fato de que o emprego da criopreservação exerce efeitos deletérios à maioria dos materiais biológicos, com ênfase à membrana celular. O dano à estrutura celular está relacionado com o comportamento peculiar da água sob condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e no processo de fusão tende

a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo capazes, por sua vez, de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (CARNEIRO & CAL-VIDAL, 2000; CARVALHO, 2007).

A crioinjúria é um evento letal atrelado à formação de gelo intracelular, ao fluxo de água para fora da célula (desidratação) e ao incremento da concentração intracelular de solutos. A congelação é um processo probabilístico; e, na maioria dos casos, a solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular. Por essa e outras razões, a congelação extracelular tende a ocorrer primeiro. Quando isso acontece, os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água em estado líquido, que passa a exibir maior pressão osmótica. Esse mecanismo promove o fluxo de água para fora da célula. A alta concentração intracelular inibe a formação de gelo, contudo a desidratação e a elevada contração de íons podem ser severas o bastante para causar danos (WOLFE & BRYANT, 2001; PEGG, 2002; ACKER & MCGANN, 2003; HUBÁLEK, 2003).

A combinação entre os mecanismos de efluxo de água e a constituição de cristais de gelo é responsável por danos irreversíveis à membrana e, por conseguinte, pela morte celular. Portanto, além da cuidadosa manipulação das variações de temperatura empregadas no processo de resfriamento e congelação de materiais biológicos, tem sido freqüente a inclusão de substâncias protetoras aos sistemas de criopreservação, conhecidas como agentes crioprotetores, com vistas a prevenir a cristalização via depressão da atividade da água.

Uso de agentes conservantes em criomicrobiologia

Na década de 40, uma descoberta acidental marcou o incremento da criobiologia moderna. Polge et al. (1949) demonstrou a ação do glicerol como agente protetor efetivo, permitindo rápidos avanços no campo da criopreservação. Gradativamente, várias substâncias como o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol e o etilenoglicol têm sido adicionadas à lista de crioprotetores efetivos. Muitos protocolos de sucesso são desenvolvidos empiricamente através da otimização da escolha do crioprotetor, das suas concentrações, do tempo e da temperatura para sua adição durante o processo de resfriamento (DAY & MCLELLAN, 1995).

Os crioprotetores têm sido classificados de várias formas. Uma das mais tradicionais divisões aplicadas consiste na classificação desses aditivos em relação à capacidade de penetração em materiais biológicos: crioprotetores penetrantes (intracelulares) e crioprotetores não penetrantes (extracelulares) (MERYMAN, 1971).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são agentes capazes de induzir o acréscimo da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular durante a congelação. Destacam-se nesse grupo: mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextran, metilcelulose, albumina, gelatina, polivinilpirolidona, polietilenoglicol, óxido de polietileno entre outros. São particularmente apropriados à preservação de microrganismos por se fixar à superfície microbiana, formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (HUBÁLEK, 2003).

Entre os crioprotetores penetrantes ou intracelulares, destaca-se a propriedade de realizar ligações com as moléculas de água, minorando a formação e o tamanho dos cristais de gelo, bem como reduzindo as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. Também se caracterizam por apresentarem baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular. Alguns exemplos são o metanol, o etanol, o etilenoglicol, o propilenoglicol, a dimetilformamida, a metilacetamida, o dimetilsulfóxido e o glicerol (NASH, 1966; HUBÁLEK, 2003).

Dentre a significativa gama de agentes crioprotetores, merecem destaque o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol, o soro sangüíneo e a soroalbumina, o leite desnatado, a sacarose, o extrato de levedura, a glicose, o PVP, o metanol, o sorbitol, o extrato de malte, o dextran e o etilenoglicol, como os mais rotineiramente empregados (HUBÁLEK, 2003). No entanto, o uso de crioprotetores pode ser limitado por efeitos tóxicos particulares ou mesmo pela indução de estresse osmótico, o que aumenta a possibilidade de alteração do perfil morfológico e/ou genético dos espécimes, além do risco de morte celular (FULLER, 2004).

Crioprotetores de alta viscosidade, como o propilenoglicol e os sacarídeos, são agentes efetivos em situações, nas quais rápidas taxas de resfriamento são aplicadas em espermatozóides, eritrócitos e bactérias. Em contraste, crioprotetores de baixa viscosidade, a exemplo do DMSO e do metanol, proporcionam uma proteção medíocre a esses tipos celulares por não modificarem a estrutura do material concentrado nos processos de congelação com taxas rápidas de resfriamento (MORRIS et al., 2006).

Deve-se destacar que a estocagem de cepas fúngicas pode ser feita em ágar batata a -20°C ou -70°C com ou sem adição de crioprotetores. Apesar das dificuldades encontradas ao se realizar o congelamento de fungos, observa-se certa taxa de sobrevivência em microrganismos submetidos à congelação sem a adição de um agente crioprotetor (BRILHANTE *et al.*, 2004). Contudo, tem sido descrito que a presença de um agente

crioprotetor apropriado pode aumentar as taxas de sobrevivência da célula fúngica consideravelmente (HUBÁLEK, 2003).

Segundo Campos et al. (2004), os crioprotetores mais comumente utilizados na conservação de fungos são o glicerol e o dimetilsulfóxido. Contudo, no estudo desenvolvido com estocagem de fungos nematófagos da espécie *Monacrosporium spp.* em nitrogênio líquido, os autores verificaram alterações no crescimento radial em isolados criopreservados com DMSO, denunciando uma relativa toxicidade (concentração dependente) desse agente sobre os fungos.

Resultados encontrados por Brilhante et al. (2004) demonstraram uma heterogeneidade no percentual de viabilidade das cepas de *Microsporium canis* em função do método de conservação estabelecido, podendo-se deflagrar uma taxa de 100% de morte de cepas de *M. canis* mediante a estocagem desse fungo em agar batata acrescido de glicerol 10% por um período de nove meses. Por outro lado, cepas de *M. canis* estocadas em agar batata acrescido de DMSO 10% alcançaram uma boa recuperação após o mesmo tempo de estocagem.

Um estudo conduzido por Girão et al. (2004) avaliou o comportamento da *Malassezia pachydermatis* frente a diferentes métodos de conservação de culturas, havendo manutenção da viabilidade das cepas estocadas em meio Dixon mesmo quanto acrescido de glicerol. O contraste inerente a esses resultados ratifica o caráter singular das cepas fúngicas em relação à conservação, assim como denuncia a necessidade de se estabelecer metodologias espécie-específicas para a estocagem desses espécimes no que tange ao emprego de substâncias protetoras.

Agentes crioprotetores também têm sido empregados para preservar a infectividade viral no decorrer do processo de estocagem. Mendez et al. (2002) demonstraram pouco ou nenhum declínio da infectividade viral em três suspensões de bacteriófagos purificados (MS2, B40-8 e Φ X174) preparadas em glicerol a 5-10% por um período superior a 30 dias em temperaturas de -70°C ou -20°C. Contudo, os autores ressaltam o fato de crioprotetores como o glicerol e o DMSO não serem usados com frequência em amostras de vírus entéricos, não sendo possível definir se esses agentes são capazes de proteger os vírus dos efeitos danosos da criopreservação sem comprometer a integridade da amostra.

Liofilização

A liofilização pode ser definida basicamente como um processo de desidratação sob condições de vácuo constituído por três etapas: congelamento, desidratação primária e

desidratação secundária. O objetivo da congelação é promover a inércia do material passivo de ser liofilizado, interrompendo reações químicas e atividades biológicas, sendo considerada uma das etapas mais críticas inerentes ao processo de liofilização. Após a congelação, o espécime é desidratado por sublimação seguindo-se a dessorção, com o emprego de baixas temperaturas de secagem sob pressões reduzidas (PAOLI, 2005).

A dessecação tem sido durante décadas o método de referência para a preservação de microrganismos a longo-prazo. Uma grande variedade de coleções de culturas depende desse processo para preservar a diversidade de seus espécimes para futura propagação. Atualmente, existem muitas áreas de interesse que fazem uso de alíquotas preservadas de microrganismos. Testes microbiológicos são realizados em diversas instituições incluindo as indústrias farmacêuticas, de alimentos e bebidas, bem como clínicas e laboratórios de diagnóstico e pesquisa. O controle de qualidade de um vasto número de testes utiliza cepas microbianas de referência como controle positivo. Esses espécimes são distribuídos graças ao uso das técnicas de liofilização que a estabilidade das culturas e seu transporte a temperaturas ambientes. Ademais, campos emergentes como o de probióticos e de controles biológicos também necessitam da preservação de certos microrganismos. As desvantagens atribuídas à liofilização estão relacionadas ao tempo consumido pelo processo, ao seu alto custo e à necessidade de otimização de protocolos específicos para cada tipo de célula e espécie microbiana (PAOLI, 2005; MORGAN et al., 2006).

Quando a liofilização é indicada como forma de preservação de microorganismos, preconiza-se a estocagem a longo-prazo de suspensões de concentração superior a 10^8 células ml^{-1} . O motivo para a estocagem de altas concentrações parte da premissa de que a maioria das células morre durante o armazenamento por longos períodos, mas um número suficiente sobrevive para assegurar a perpetuação da cepa (MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; MORGAN et al., 2006).

A liofilização causa uma forma de dano denominada lioinjúria. Agentes protetores podem ser adicionados durante o desenvolvimento dos microrganismos, antes da congelação ou da secagem. Cabe ressaltar que o tipo de protetor depende largamente do microrganismo. Contudo, existem apenas alguns poucos que parecem funcionar bem com muitas espécies, incluindo o leite desnatado, soro, trealose, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose e polímeros como dextran e polietilenoglicol (HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005).

A congelação é a primeira etapa do ciclo de liofilização. Durante essa fase, a suspensão líquida é resfriada com a formação de cristais de gelo. À medida que o processo de congelação avança, gradativamente a água, contida no líquido, congela. Isso resulta no

incremento da concentração do líquido remanescente. Com a suspensão tornando-se mais concentrada, a viscosidade aumenta, induzindo à inibição de nova cristalização. Esse líquido, altamente concentrado e viscoso, solidifica, produzindo uma fase amorfa, cristalina ou amorfo-cristalina combinada (ABDELWAHED et al., 2006; HOTTOT et al., 2007).

A secagem primária envolve a sublimação do gelo existente no material congelado, ou seja, o processo converte diretamente a água no estado sólido (gelo) para o gasoso (vapor). Nesse processo, o calor é transferido da prateleira do liofilizador para a solução congelada através da bandeja e do frasco sendo conduzido à área de sublimação. O gelo sublima, e o vapor de água formado passa através das porções secas do produto para a superfície da amostra. O vapor de água é transferido da superfície do produto através da câmara até o condensador, onde é liquefeito. No fim da sublimação, um tampão poroso é formado. Seus poros correspondem aos espaços antes ocupados pelos cristais de gelo (ABDELWAHED et al., 2006).

Finalmente, a secagem secundária envolve a remoção da água absorvida pelo produto, a água que não se separou como gelo durante a congelação e, conseqüentemente, não sublimou. A água não-congelada deve ser adsorvida na superfície do produto cristalino, pois sua presença, em quantidades suficientes, pode causar a rápida decomposição do produto quando estocado à temperatura ambiente (ABDELWAHED et al., 2006).

O procedimento de estocagem e acondicionamento irá determinar a vida de prateleira de qualquer produto liofilizado. À semelhança da maioria dos produtos perecíveis, os reativos mais corriqueiros a serem evitados são: oxigênio, luz, contaminação microbiana, umidade e temperaturas elevadas. Por essa razão, as opções de acondicionamento apresentam-se como diferentes tipos de barreiras a esses agentes reativos. Em geral, produtos liofilizados são armazenados em ampolas ou frascos de vidro. Os poucos estudos sobre o acondicionamento e a viabilidade desses produtos, bem como sua vida de prateleira são em geral de acesso restrito das indústrias privadas e, portanto, resguardados como segredo comercial (COSTA et al., 2002; MORGAN et al., 2006).

A taxa de sobrevivência das bactérias Gram (+) imediatamente após a liofilização tende a ser maior do que a das bactérias Gram (-) num mesmo intervalo de tempo, sugerindo que bactérias Gram (+) apresentam uma maior resistência à dessecação, quando comparadas às bactérias Gram (-), e que essa diferença se deve à estrutura celular. Observa-se ainda que a taxa de sobrevivência de algumas espécies é fixa enquanto a de outras espécies exibe um declínio durante os primeiros cinco anos, tendendo a estabilizar por volta dos 15 anos (MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000).

Com relação aos vírus, verifica-se a detecção de considerável infectividade residual em modelos experimentais de liofilização tanto entre vírus envelopados quanto não-envelopados. Quanto aos fungos, quase todas as grandes coleções têm sua preservação alicerçada na liofilização com a manutenção da viabilidade de alguns fungos por períodos de 17 a 21 anos. Contudo, fungos que não esporulam ou possuem esporos excessivamente delicados ou grandes não suportam o processo de liofilização (FIGUEIREDO, 2001; UHLENHAUT et al., 2005).

Miyamoto-Shinohara et al. (2006) analisaram a sobrevivência de uma variedade de espécies de microrganismos submetidos à estocagem por períodos superiores a 20 anos. Os espécimes foram liofilizados, selados a vácuo em ampolas e estocados em ambiente escuro a 5°C. A espécie de levedura testada, *Saccharomyces cerevisiae*, apresentou apenas 8% de sobrevivência, quando recuperada logo após o processo de liofilização, mas a perda subsequente à estocagem foi a menor entre todos os microrganismos testados, alcançando uma taxa de sobrevivência de 97,7% por ano. As bactérias Gram-negativas testadas, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Enterobacter cloacae*, apresentaram uma sobrevida pós-liofilização de 42,6%, 33,5% e 50,8%, respectivamente, o que foi maior do que o observado para a *S. cerevisiae*, contudo a perda subsequente à estocagem foi superior à encontrada na *S. cerevisiae*, com taxas de sobrevivência anual correspondendo a 91%, 87,5% e 84,5%. Entre as bactérias Gram-positivas estudadas, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*, evidenciou-se sobrevivência de 62,5% e 85,2% logo após o processo de liofilização, e a taxa de sobrevivência durante a estocagem alcançou cerca de 96% ao ano para ambas as espécies, valores superiores aos encontrados entre bactérias Gram-negativas. A análise desses resultados mediante outros dados publicados sobre diferentes condições de liofilização sugere que a sobrevivência durante o processo de estocagem é fortemente influenciada pelo grau de vácuo sobre o qual as ampolas são seladas. Assim, a sobrevida de cada espécie pode ser atribuída ao alto nível de dissecação e à vedação sob condições de vácuo.

SERVIÇOS DE COLEÇÃO DE CULTURAS EM MICROBIOLOGIA

A contínua necessidade de manutenção de microrganismos para fins acadêmicos e comerciais conduziu à constituição de uma rede de estocagem de coleções microbiológicas. Os Núcleos ou Serviços de Coleções de Culturas tornaram-se responsáveis por um amplo trabalho em microbiologia. Sua função primária é coletar, manter e distribuir microrganismos vivos e sem variações genéticas (cepas de referência) atendendo às requisições desses

espécimes para diversos fins, incluindo atividades de ensino e pesquisa, controle de qualidade, biotecnologia etc. As coleções de culturas são comparadas com bibliotecas; mas, ao invés de livros, elas encerram material vivo. A operação e o gerenciamento de serviços de coleções microbiológicas requerem capacitação técnica especializada e infra-estrutura específica, além de cuidados especiais com relação às práticas de controle de qualidade, biosegurança e autenticação dos acervos (FIGUEIREDO, 2001; URUBURU, 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Podem ser citados como núcleos de coleções com relevância mundial o IMI (International Mycological Institute), com sede na Inglaterra; a ATCC (American Type Culture Collection), de Maryland, EUA; o CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), em Baar-Delft, Holanda; o IFO (Institute For Fermentation), em Osaka, Japão; o JCM (Japan Collection of Microorganisms), em Wako, Japão; a MUCL (Mycotheque De L'Universite Catholique de Luvain), localizada em Luvain-le-Neuve, Bélgica entre outras. No Brasil, as iniciativas nessa área são restritas, podendo-se destacar as coleções mantidas em Institutos de Pesquisa e Faculdades como a Fundação Fiocruz, no Estado do Rio de Janeiro; o Hospital de Medicina Tropical de São Paulo; a Universidade Federal do Recife; o Instituto Biológico de São Paulo; a Fundação André Tozello, em Campinas – SP (FIGUEIREDO, 2001; OLIVEIRA et al., 2006); o Centro Especializado em Micologia Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (CEMM) entre outros.

Serviços de coleção de culturas, como a World Federation for Culture Collections (WFCC) e a European Culture Collection Organization (ECCO), funcionam como fóruns de discussão, reunindo uma massa crítica de coleções e usuários no sentido de coordenar atividades, bem como cambiar informações e tecnologias capazes de facilitar o progresso nesse âmbito do conhecimento. O WFCC congrega um número total de sócios que gira em torno de 700, distribuídos em 62 países e com cerca de 470 coleções registradas no World Data Center for Microorganisms (WDCM). As coleções cadastradas no WDCM reúnem mais de um milhão de cepas, sendo 44% dessas representadas por fungos, 43% por bactérias, 2% por vírus, 1% por células vivas e 10% por outros espécimes (incluindo plasmídeos, plantas, células animais e algas) (SMITH, 2003).

Torna-se cada vez mais evidente o papel dos materiais biológicos como novos recursos tanto nos setores da pesquisa e do desenvolvimento quanto nos processos produtivos. A genômica, a pós-genômica e outras áreas emergentes no setor de bioinformática têm possibilitado a abertura de novas linhas de pesquisa, exercendo uma pressão de demanda sobre os serviços de coleções de culturas biológicas. Nesse contexto, as coleções são

essenciais ao suporte do desenvolvimento biotecnológico, fornecendo espécimes certificados e agregando valores como insumos e informações associadas (BRASIL, 2002).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estocagem e preservação de materiais microbiológicos revela-se como um empreendimento de alta complexidade. No campo teórico, destaca-se o volume significativamente reduzido de obras em torno do tema, identificando-se uma maior concentração das produções nas áreas da reprodução e da indústria farmacêutica e alimentícia. No âmbito da prática, o desenvolvimento de metodologias esbarra na demanda de recursos e infra-estrutura peculiares ao processo, como destaca Cánovas e Iborra (2003), a manutenção das coleções de culturas requer compromisso, trabalho duro e o exercício contínuo da pesquisa, nem sempre amparada pelos melhores recursos ou reconhecida pela comunidade científica.

Não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a estocagem e preservação de microorganismos a longo-prazo. Portanto, a eleição do procedimento mais adequado à criopreservação deve ser norteadas pelas características do espécime em estudo, bem como pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis. Muitas células, tecidos e microorganismos para os quais há uma crescente demanda ainda esperam pelo desenvolvimento de metodologias adequadas à sua conservação, tornando a criobiologia um campo de vasto potencial para o desenvolvimento de pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. freeze-drying of nanoparticles: formulation process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688- 1713, 2006.
- ACKER, J. P.; MCGANN, L. E. Protective effect of intracellular ice during freezing? **Cryobiology**, v. 46, p. 197-202, 2003.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico**. Brasília, SENAI/DN, 2002.
- BRILHANTE, R.S.N.; CAVALCANTE, C.S.P.; SOARES-JUNIOR, F.A.; MONTEIRO, A.J.; BRITO, E.H.S.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Evaluation of *Microsporium canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, p. 499-504, 2004.

- CAMPOS, A. K.; MOTA, M. DE A.; ARAÚJO, J. V. DE; CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação, **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 465-469, 2004.
- CÁNOVAS, M.; IBORRA, J. L. Culture collections and biochemistry. **International Microbiology**, v. 6, p. 105-112, 2003.
- CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 423-432, 2000.
- CARVALHO, F. DE. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.
- CHAPMAN, T. Lab automation and robotics: automation on the move. **Nature**, v.421, n. 6923, p. 661-666, 2003.
- COSTA, E., USALL, J., TEIXIDO, N., TORRES, R., VINAS, I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 873-878, 2002.
- DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995.
- DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. **Cryobiology**, v. 46, n. 1, p. 33-42, 2003.
- DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 268-272, 2004.
- FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 73-82, 2001.
- FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in frozen state. **Cryo Letters**, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.
- HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 217-234, 2003.

- HOTTOT, A.; VESSOT, S.; ANDRIEU, J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, p. 666-674, 2007.
- HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.
- KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cultured cells**. 2.ed. London: Academic Press, 1991.
- MENDEZ, J.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; CONTRERAS, K.; MOOIJMAN, K.; ARAUJO, R. Conservation of phage reference material and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. **Journal of Virological Methods**, v. 106, p. 115-124, 2002.
- MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 8, p. 173-183, 1971.
- MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying: a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 183-193, 2006.
- MORRIS, G. J.; GOODRICH, M.; ACTON, E.; FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 323-334, 2006.
- MYAMOTO-SHINOHARA, Y., IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MARAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, v. 41, p. 251-255, 2000.
- MYAMOTO-SHINOHARA, Y., SUKENOBE, J.; IMAIZUMI, T.; NAKAHARA, T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, v. 52, p. 27-32, 2006.
- NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. **Cryobiology**. London-New York: Academic Press, 1966.
- OLIVEIRA, V. M. DE.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **MultiCiência**, v. 7, 2006.
- PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 897-910, 2005.
- PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2002.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

- SMITH, D. Culture collections over the world. **International Microbiology**, v. 6, p. 95-100, 2003.
- SU, S. C.; GARBERS, S.; RIEPER, T. D. TONIOLO, P. Temperature variations in upright mechanical freezers. **Cancer Epidemiologic Biomarkers**, v. 5, p. 139-140, 1996.
- UHLENHAUT, C.; DÖRNER, T.; PAULI, G.; PRUSS, A. Effect of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. **Biomaterials**, v. 26, p. 6558-6564, 2005.
- URUBURU, F. History and services of culture collections. **International Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 101-103, 2003.
- VYSEKANTSEV, I. P.; GURINA, T. M.; MARTSENYUK, V. F.; PETRENKO, T. F.; KUDOKOTSEVA, E. V.; KOSHCHIY, S. V.; GROSHEVOY, M. I. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. **Cryo Letters**, v. 26, n. 6, p. 401-408, 2005.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

Capítulo II

CAPÍTULO II

TÍTULO DO ARTIGO

Conservação de amostras de vírus da Raiva em serviços especializados

(Rabies virus conservation in specialized services)

Maria Fátima da Silva TEIXEIRA^{1*}, Edmara Chaves COSTA¹, Benedito Neilson ROLIM¹,
Rosivaldo Quirino BEZERRA Júnior¹, Tereza D'Avila de Freitas AGUIAR¹

Endereço e local de origem dos autores:

¹Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Virologia, Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi, CEP 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil.

*Correspondência (e-mail): labovirfavetuece@yahoo.com.br

RESUMO

A construção do conhecimento humano acerca da Raiva tem sido edificada durante séculos, contudo, não foi suficiente para garantir a erradicação da doença ou sua cura definitiva. Da mesma forma, muitas perguntas a respeito da doença permanecem sem respostas. Nesse sentido, o incremento de técnicas mais eficientes de conservação de amostras de vírus da Raiva pode subsidiar o desenvolvimento de novas pesquisas e, por conseguinte, elucidar alguns mistérios dessa doença milenar. Assim, o objetivo desse estudo foi o de averiguar os métodos de criopreservação empregados na conservação de amostras de vírus da Raiva nos principais serviços especializados do País. Realizou-se uma pesquisa do tipo exploratório-descritiva e transversal, mediante aplicação de um questionário semi-estruturado a profissionais responsáveis pelos setores de diagnóstico, pesquisa e/ou controle e prevenção da Raiva em serviços especializados. Abordou-se perguntas sobre os protocolos e rotinas empregadas na preservação das amostras do vírus da Raiva, tempo e objetivo da estocagem, tipos de amostras preservadas e recipientes utilizados entre outras. Das instituições analisadas (n=24), observou-se que 70,8% realizam atividades de diagnóstico e cerca da metade desses serviços desenvolve pesquisas científicas. Observa-se que os centros de pesquisa concentram-se no eixo sudeste-sul. Quanto à forma de conservação, a mais difundida é a criopreservação a -20°C (66,7%). Por outro lado, a tecnologia de criopreservação a -80°C já se encontra disponível em mais da metade dos estabelecimentos estudados (54,2%), contudo não houve relato dessa técnica entre as instituições localizadas na região Nordeste. O espécime de escolha para a estocagem é o tecido nervoso (91,7%) e,

em menor escala, alguns serviços armazenam concomitantemente, suspensões virais (33%) e soros sanguíneos (29,2%). Não existe unanimidade quanto ao tipo de recipiente utilizado para a criopreservação, destacando-se o coletor universal (45,8%) como embalagem de uso corrente. Os tubos “Ependorff” são empregados de forma significativa (41,7%), mas não existe consenso quanto ao uso de tubos estéreis ou livres de mnase. O tempo de armazenamento varia com os objetivos estabelecidos por cada serviço, havendo uma tendência a estocagens mais longas quando as amostras são destinadas a composição de bancos de amostras e execução de pesquisas. Vale destacar que, apesar do status de biosegurança da Raiva ser estabelecido como nível dois, 20,8% dos participantes declararam suas instituições como nível um ou não especificaram o nível de biosegurança (29,2%). Existem questões delicadas a serem discutidas sobre os protocolos de criopreservação empregados em amostras de vírus da Raiva, especialmente no que tange a heterogeneidade dos protocolos e a distribuição de recursos materiais para o desempenho dessa atividade entre as regiões sócio-demográficas do país.

PALAVRAS-CHAVE:

Vírus da Raiva, Brasil, Conservação, Criobiologia.

(Artigo em Elaboração)

Capítulo III

CAPÍTULO III

Periódico: Revista do Instituto Adolfo Lutz (Enviado)

TÍTULO DO ARTIGO

Conservation of Rabies virus viability after short-term cryopreservation in internal and external cryoprotectants agents

(Conservação da viabilidade do vírus da Raiva após criopreservação a curto-prazo em agentes crioprotetores internos e externos)

Edmara Chaves COSTA^{a,1}, Maria Fátima da Silva TEIXEIRA^{a,*}, Tereza D'Ávila de Freitas AGUIAR^a, Benedito Neilson ROLIM^a, Phyllis Catharina ROMIJN^b, Marcos Fábio Gadelha ROCHA^c

a Laboratory of Virology - LABOVIR, Faculty of Veterinary, University of Ceara State, Fortaleza, CE, Brazil

b Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro - PESAGRO-RIO, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

c Post-Graduation Program in Veterinary Science - Faculty of Veterinary, University of Ceara State, Fortaleza, CE, Brazil

Present address: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700 - Campus do Itaperi - CEP 60740-000 - Fortaleza, Ceará, Brasil.

Tel.: +55 85 31019849; fax: +55 85 31019840.

*Corresponding author. *E-mail address:* labovirfavetuece@yahoo.com.br (M.F.S. TEIXEIRA)

¹ Institution where the work was performed: Laboratory of Virology, University of Ceara State, Brazil.

ABSTRACT

Rabies virus cryopreservation has been briefly described in the scientific literature. The major researches about viral conservation emphasizes Rabies diagnosis in decomposed samples. Until now little information is available concerning the use of cryoprotectants for Rabies virus cryopreservation. The aim of this work was to verify the viability of Rabies virus after freezing/thawing procedures and to assess the effect of dimethyl sulphoxide (DMSO), glycerol (GLY), polyethyleneglycol (PEG) and sucrose (SUC), in different concentrations, on Rabies virus cryopreservation. Virus viability was tested by isolation in mouse inoculation test, titration and immunofluorescent antibody test before and after 30 days of freezing procedures. In the present study, the results demonstrate that the technique of cryopreservation at -20°C has limitations regarding its application in the conservation of brain tissue samples infected with Rabies virus, according to the impairment of viability viral samples even in protocols for short-term storage. After a 30 days freezing period, the fluorescence intensity of viral particles in the samples cryopreserved (+++) was lower than that observed in fresh samples (++++).

However, the use of sucrose at 10% or 68% produced a preservative effect in the samples, enabling the maintenance of the fluorescence (+++++) after 30 days of cryopreservation.

Key words. CVS, freezing of virus samples, Rabies virus, infectivity, conservation procedures, Rabies virus assays, sample conservation.

RESUMO

A criopreservação de vírus da Raiva tem sido descrita de forma sucinta na literatura científica. A maioria das pesquisas dedicadas ao estudo da conservação viral tem como foco o diagnóstico da Raiva em amostras submetidas à decomposição. Até o presente, poucas informações encontram-se disponíveis acerca do uso de agentes crioprotetores na conservação a frio de vírus da Raiva. O objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade de vírus da Raiva ante procedimentos de congelamento/descongelamento e avaliar o efeito do dimetilsulfóxido (DMSO), do glicerol (GLI), do polietilenoglicol (PEG) e da sacarose (SAC), em diferentes concentrações, na criopreservação de vírus da Raiva. A viabilidade viral foi testada por isolamento pelos testes de inoculação em camundongos, titulação viral e imunofluorescência direta antes e 30 dias após terem sido instituídos os protocolos de congelamento. No presente estudo, os resultados demonstram que a técnica de criopreservação a -20°C apresenta limitações no que tange a sua aplicação na conservação de amostras de tecido nervoso infectadas por vírus da Raiva, em função do comprometimento da viabilidade viral das amostras mesmo em protocolos de 30 dias de estocagem (conservação de curto-prazo). Após 30 dias de congelamento, a intensidade da fluorescência das partículas virais nas amostras criopreservadas (+++) foi menor do que a observada em amostras frescas (++++). Contudo, o uso da sacarose nas concentrações de 10% ou 68% produziu um efeito conservante nas amostras, possibilitando a manutenção da fluorescência (+++++) após a criopreservação das amostras por 30 dias.

Palavras chaves. CVS, congelamento de amostras de vírus, infectividade de vírus da Raiva, análise de vírus da Raiva, conservação de amostra.

INTRODUCTION

The natural course of a life cycle dictates that biological materials will decay and die. The structure and function of the known organisms change and will be lost with time. Attempts to stop the biological clock have been chased by ancient and contemporaneous minds. At the center of many such schemes have been experiments with temperature and water content. Thereby, the development of cooling technologies provide a means of slowing the rate of

deterioration of perishable goods and the use of much lower temperatures has offered a means of storing organisms in a state of suspended animation for extended, even indefinite, periods¹. Cryopreservation means that materials are stored at low (from -20 to -80°C in freezers) or ultra-low temperatures (-150°C in liquid nitrogen containers); more recently, cryopreservation takes place in the liquid or in the vapor phase of nitrogen. However, the major drawback of cryopreservation consists in severe damage of the cells exposed to freezing. The cryoinjury is a lethal event, produced by the formation of intracellular ice, on the efflux of water outside the cell, and on an increase in the concentration of intracellular salts in the solution. The most critical range occurs between +15 and 0°C, while minor events occur at temperatures below 0°C, although thermal shock can occur between 0°C and -80°C. So, the modern era of cryobiology started with the discovery that some substances might protect eukaryotic cells against freeze damage; after this initial observation, several cryoprotectants agents were discovered and are now widely used^{2,3,4}.

Nowadays, cryopreservation techniques are frequently employed to conserve microbial biodiversity and this is one of the key roles performed by microbial service culture collections. Millions of human, animal and microbiological samples are stored each year for diagnostic and research purposes, including applications in microbiology and infectious diseases, epidemiology, genetics etc. In the microbiological setting, the most important reasons for biobanking include the possibility of realize epidemiological studies intended to compare samples within the same epidemic episode or from episodes occurring at different points in time or at distant locations. Stored samples offer unique opportunities to study the genetic characteristics of microorganisms, to establish transmission modalities in the local or worldwide settings, to perform additional analysis on old samples when new questions arise or when new analytical methods were developed².

In virology, a range of procedures exists for maintaining virus stocks and these depend to some extent on the peculiar properties of the particular viruses. They're noncellular structures, much smaller and less biochemically complex than the simplest unicellular organisms. This relative simplicity, diminutive size and the absence of free water are largely responsible for the stability of viruses at diverse temperatures and their fairly easy preservation. Many viruses can be kept for months at refrigerator temperatures and stored for years at very low temperatures without the need for special preservatives or carefully regulated slow freezing techniques. Nevertheless, RNA viruses are less stable than DNA viruses and those with lipid envelopes, like Rabies virus, are often less stable than non-enveloped viruses at ambient temperatures⁵.

For the last century, Rabies virus has been studied in many research institutes around the world due to its crucial importance in public health. However, its cryopreservation has been briefly described in the scientific literature. The major researches about viral conservation emphasizes Rabies diagnosis in decomposed samples^{6,7,8,9,10,11}. In cases where the sample is required only as an antigen for routine diagnostic and the retention of virus infectivity is not essential, the virus samples can be stored without loss of antigenic activity, even though the infectivity might be significantly reduced⁵.

On the other hand, in many research situations there is only a small window of opportunity after which the study subject may no longer be available or conditions may have changed. Thus, these precious samples must be handled and stored carefully; allowing archiving of material, repeated experiments from the same specimen source and, by allowing distribution of stored samples, facilitates research collaboration^{12, 13}. Storage or banking of the samples is, in itself, a central issue especially for long-term studies and for sample use in new studies in the future. Storage can affect the quality of the samples and determines whether their future use is possible¹³.

The infectivity of many viruses decrease during transport and storage, resulting in isolation failures from clinical specimens and diminished titers in virus stocks. This phenomenon occurs more rapidly at 20 and 4°C than at ultralow temperatures. Since the former requires equipment that is not commonly found in most clinical and diagnostic laboratories, many virologists find it useful combining infected samples with a cryoprotectant. Glycerol, dimethyl sulphoxide, albumin, balanced salt solutions plus gelatin, animal sera, skim milk, polyethyleneglycol, sucrose and sorbitol are among the more commonly used cryoprotectants¹⁴. The optimum dimethyl sulphoxide (DMSO) concentration varies widely, from 1 to 32% (median ~10%). Glycerol (GLY) (1,2,3-propanetriol), together with DMSO, has been the most widely used cryoprotector agent in microbiology. Glycerol was applied at concentrations of 2–55% (median 10%), for the freezing of various viruses. Polyethylene glycol (PEG) has been used in cryomicrobiology at concentrations of 5–45% (median 10%) and sucrose (SUC), at concentrations of 1–68% (median 10%), has quite frequently been used for the cryopreservation of microorganisms³. Unfortunately, none of these has proven to be uniformly satisfactory for all virus groups¹⁴.

Until now little information is available concerning the cryopreservation of Rabies virus and the use of cryoprotectants in such samples. Thus, the aim of this work was to evaluate the viability of Rabies virus after freezing/thawing procedures and assess the effect of dimethyl

sulphoxide (DMSO), glycerol (GLY), polyethyleneglycol (PEG) and sucrose (SUC), in different concentrations, on Rabies virus cryopreservation.

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

Swiss albino mice (*Mus musculus*), three-four weeks old, weighting 10-16g were used. The probability sampling was utilized in order to have a random selection method that assures that the different units in the population have equal probabilities of being chosen¹⁵.

All experiments were performed according to the Committee of Animal Handling and Ethical Regulation from University of Ceara State, Fortaleza, CE, Brazil (protocol number: 08185881-7). The mice were anesthetized individually before every invasive procedure using inhalation anesthetics (halothane or isoflurane, depending on availability). Inhalant anesthetics were either used to euthanatize the mice in terminal state of the disease. The animal was placed in a closed receptacle containing cotton or gauze soaked with an appropriate amount of the anesthetic. Vapors were inhaled until respiration ceases and death ensues, associated to a longer induction time.

Virus strain

The mice were infected with the murine-adapted Challenge Virus Standard (CVS) strain of Rabies virus. This strain seems to be a good model for the study of Rabies virus because the mortality curves following intracerebral inoculation are clear cut, with no survival when doses are higher than 10 x 50% lethal doses¹⁶. The CVS strain induced clinical signs which are undoubtedly those of Rabies, resulting from predictable (fixed) properties in terms of incubation period, pathological and clinical effects. In addition, it represents a more homogeneous viral population. The work strain CVS-31 was ceded by Dr. Phyllis Catharina Romijn (PESAGRO-RIO) in research collaboration.

Samples

A total of 50 samples of encephalic tissue from Rabies virus CVS-31 strain infected mice were used. The brains of all mice that have died after the viral inoculation with CVS-31 strain, or that have been euthanized when prostrate (terminal clinical signs of Rabies), were removed. After disinfection with 70% ethanol, the skin of the head and neck was cut away with forceps and scissors, exposing the skull. The skull was grasped in the orbits with mouse-

tooth forceps and the skullcap was detached with curved scissors, thereby exposing the brain¹⁷. The tissues (0.2-0.4g each) were removed with a curette and transferred to a sterile universal collector. A composite sample was made in which material collected from several individuals was combined and homogenized in a pooled sample, reducing the subject-to-subject variability and thus increasing the power of statistical validity¹⁸. Viral diluents (Phosphate Buffered Saline – PBS pH7.2 with a penicillin-streptomycin antibiotic combination) were used for inoculation of negative control that was either pooled.

Cryoprotectants agents

A selection of some of the most widely used cryoprotector agents in microbiology was made. In literature, dimethyl sulphoxide (DMSO) concentrations varies from 1 to 32% (median ~10%), glycerol (GLY) (1,2,3-propanetriol) was applied at concentrations of 2–55% (median 10%), polyethylene glycol (PEG) has been used at concentrations 5–45% (median 10%) and sucrose, at concentrations 1–68% (median 10%)³. The median and maximum concentrations of the cryoprotectants agents cited on microbiology literature were used. The median of cryoprotectants concentration were chosen because, in certain analysis, it may reflect more accurately the measure of central tendency in the presence of outlier values than is the mean¹⁹. Cryoprotectants maximum concentrations were employed to verify if in higher concentrations it causes decline of Rabies virus viability.

Experimental procedure

The encephalic tissues pooled sample containing Rabies virus particles was divided into 10 positive aliquots (0.5g each), in duplicate. Ten aliquots were used to analyze the viability of Rabies virus samples immediately after cryoprotectants agents contact (T_0). The other aliquots were taken randomly, submitted to freezing/thawing protocols and analyzed after a 30-days period (T_{30}), as shown in Fig.1.

Titration, virus isolation by mouse inoculation test and direct fluorescent antibody test were performed to evaluate Rabies virus viability after the exposure to DMSO, GLY, PEG or SUC, before and after the cryopreservation experiments. The cryoprotectants were prepared in double straight concentration using PBS pH 7.2 as diluent. Eight aliquots (0.5g each) of the pooled sample were transferred to vials containing 2.0ml of cryoprotectant solution at 10% and 32% DMSO, 10% and 55% GLY, 10% and 45% PEG or 10% and 68% SUC – each in duplicate. Two aliquots were used as positive controls, one in pure state (sample control, PC-CVS) and the other in PBS pH7.2 solution (cryoprotectants control, PC-PBS). One duplicate

was destined for the viability tests and the other for the cryopreservation treatment. An extra duplicated aliquot of normal mice brain was employed as negative control (NC-NMB).

Samples were equilibrated in the cryoprotectants (protocols 3–10) for 20 min at 20°C and in PBS pH 7.2 (protocol 2). After equilibration, the specimens were washed to remove the cryoprotectant as follows: suspensions containing the virus were diluted in 2.0 ml PBS, equilibrated for another 5 min at room temperature, and then centrifuged at 150-200G for 5 min. This procedure was performed a second time. The samples were finally suspended in 2.0 ml viral diluents (modified from²⁰) and the viability tests were made immediately.

Freezing and thawing process

For freezing, samples were equilibrated in 10% and 32% DMSO, 10% and 55% GLY, 10% and 45% PEG or 10% and 68% SUC (protocols 11–18) and in PBS pH 7.2 (protocol 19) for 20 min at 20°C, as in the viability test. After the equilibration period, the vials were transferred to a -20°C freezer and kept at this temperature for a 30-days period.

For thawing, the vials were taken from the freezer, warmed in air at room temperature for 1 min and immersed in a water-bath at 37°C until it thawed²⁰. Thereafter, the cryoprotectants were removed as described above and the samples were submitted to the viability tests as follows.

Mouse inoculation test

Virus isolation was conducted by mouse inoculation test (MIT)¹⁷. The encephalic tissues were triturated in a mortar (pooled samples), diluted to 20% in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, added 500UI of penicillin and 2mg of streptomycin per ml of tissue suspension to prevent animal death from possible bacterial contamination of the tissue suspension, and clarified by centrifugation at 900G for five minutes. The supernatant was collected and 0.03ml was used to inoculate each of 10 to 12 Swiss albino mice, three-four weeks old, through intracerebral route. It was used the BD Ultra-fine IITM U-100 insulin syringes - short needle - 31 gauge, 8mm (5/16") for 30 units or less. The inoculated animals were observed daily up to 21 days. Mice receiving diluents only were used as negative controls. Animals dying within the first four days after inoculation and without signs suggestive of Rabies were excluded.

Virus titration test

Controls and stock virus titrations were performed at designated intervals. A 10% suspension of the pooled sample was prepared in PBS pH7.2 solution¹⁷. Serial 10-fold dilutions (10^{-1} to

10^{-6}) were made of supernatant fluid, and 0.03 ml of each dilution was inoculated by intracerebral route in either of six Swiss albino mice (*Mus musculus*), three weeks old, weighting 10-12g and examined daily. Rabies virus LD₅₀ titers were calculated^{21,22} and expressed as Log₁₀ 50% lethal doses (Log₁₀ 50% LD₅₀).

Fluorescent antibody test

The viral antigens in infected samples were detected by the direct immunofluorescent antibody staining technique (FAT)^{23,24}. The impression smears were made on multi-well immunofluorescence glass slides and fixed for 30 min in cold acetone at a -20°C environment, and air dried. The samples were then incubated at 37°C with fluorescein isothiocyanate-labeled rabbit polyclonal antinucleocapsid antibody absorbed with 10% normal mouse brain (BIO-RAD Laboratories-France, Catalog Number 357-2112) for 60 minutes at 37°C in a humid chamber. Slides were washed with PBS pH 7.2 in two successive 5-minute wash periods. After rinsing with distilled water, the smears were air-dried and examined using a standard incident light ultraviolet microscope (Carl Zeiss, Germany), with x40 objective and x10 eyepiece lenses (total magnification x400).

Each smear was examined and graded by two readers independently and where disagreement occurred the respective cases were re-examined and a consensus reached. All the smears were graded from (–) to (++++), according to the amount of fluorescent antigen, as follows: (–), no antigen throughout whole smear; (+), antigen very scanty, one or more particles in fewer than 50% of microscope fields; (++) , antigen scanty, one or more particles in fewer than 100% of fields, but more than 50% of fields; (+++) , antigen abundant, one or more particles in each field, but the amount per field was ‘possible to count’; (++++), antigen very abundant in every field and amount per field was ‘not possible to count’. For the slides read of Rabies samples smears, scores 3 and 4 were considered ‘easy’, while specimens with scores 1 and 2 were considered ‘difficult’ to diagnose²⁵.

RESULTS

The Rabies virus samples titres are shown in Table 1. There was an increase of viral titres (by 1.8 logs) in CVS strain seed. On the other hand, in a 30-day period (T₃₀) the titre of the pooled sample was reduced from 5.40 to 4.69 compared to fresh sample (T₀), before freezing/thawing procedure.

The results of viability tests in Rabies virus samples, after exposure to internal and external cryoprotectants, are set out in Table 2. Before the freezing/thawing procedure, differences

were observed in the immunofluorescent staining degree between the CVS strain positive control (PC-CVS), positive control exposed to PBS pH 7.2 (PC-PBS) and cryoprotectants treatments. While the PC-CVS (T_0) sample demonstrated the maximum fluorescence classification, there was a decrease on fluorescent degree from PC-PBS, as identified in samples exposed to DMSO (10%), GLY (10% and 55%) and PEG (10% and 45%). Decline in fluorescence profile was more severe in DMSO (32%) treatment. However, the outcome of sucrose cryoprotectant treatment (using either 10% or 68%) was equivalent to that observed in the PC-CVS (control not treated) Fig. 2-A.

Table 3 shows the effects of freezing and storage temperature on Rabies virus viability tested by mouse inoculation and direct fluorescent antibody test after a 30 days period. No difference was observed in the immunofluorescent staining degree subsequently to cryopreservation, irrespective of the cryoprotectants treatments or the concentration used. Otherwise, the fluorescence intensity found in PC-CVS (T_{30}) following the cryopreservation was lower than in fresh samples and the mean survival time (MST) in the mouse inoculation test increased one day. Only when the pooled samples were cryopreserved without cryoprotectant (PCCVS) did the fluorescence degree differ in the viability tests. Assays on negative control of normal mice brain (NC-NMB) were uniformly negative Fig.2-B.

DISCUSSION

The measurement of virus titres provides information about the viral viability after the freezing/thawing protocol but also the replicative ability of CVS strain to increase titres in mice-brain-passages. Three mice-passages of the CVS strain seed (lyophilized specimen) were made in order to achieve the desired viral amplification. This process induced an increase of viral titres (by 1.8 log). Otherwise, in a 30-day period, the pooled sample titre decreases when compared to fresh sample. The data shown here indicates that the Rabies virus samples had the viability compromised by the freezing/thawing protocol in the absence of cryoprotectant agents.

The Rabies virion capsid is surrounded by the host cell-derived membrane²⁶, what can be interpreted as a susceptibility feature of viral particle to mechanical damage caused by ice crystals formation, similar to those inflicted on host cells. According to Howell and Miller¹⁴, enveloped viruses demonstrate greater lability during storage than those lacking envelopes. Since viruses acquire their envelopes by budding through cellular membranes, the dynamics associated with deleterious changes which occur during freezing and thawing may affect both viruses and cells in a similar manner. The mechanisms of membrane and viral envelope

damage appear to be caused by the formation of external and internal ice, excessive changes in pH and solute concentration, and ice recrystallization, during freezing and thawing. In fact, decreases in viral titer correlate with demonstrable changes in areas of the viral envelope presumed to be associated with viral infectivity.

In addition, it was also shown that cryopreserved samples are still viable after 30 days at low temperature (-20°C), but a decrease of titer occur. The present study showed that almost all treatments demonstrated a reduced quality of virus particles when compared to the control in the fluorescent antibody test. This reduction is presumable due to virus losses caused by the washings to remove the cryoprotectants. This is confirmed by the fact that in the treatment where the samples were not exposed to cryoprotectants (PC-PBS/ T_0), but were submitted to washings and centrifugations²⁰, the samples slide fluorescence degree was lower than in the fresh control (PC-CVS/ T_0). However, when Rabies virus samples were frozen without cryoprotectant (PC-CVS/ T_{30}), the slides degree examined after thawing was lower than the fresh control (PC-CVS/ T_0). In this case, the reduced of slides degree may be due cells rupture caused by the freezing and thawing procedures. Moreover, this inconsistency can be explained by the labile nature of RNA and the high ribonuclease content of brain tissues, and most importantly, degradation of RNA²⁷ in the pooled stores samples, promoting viral degradation and loss of viability.

The increase of the mean survival time (MST) in the mouse inoculation test (MIT) might be explained by lower viral virulence. This finding is similar to that observed by Lopes et al.²⁸ studying long-term stored samples, frozen under natural conditions without any preservation substance, that encountered a higher MST (12-17 days). Considering that the average of mouse incubation period is five days and death occurs between one and three days after clinical signs initial manifestation, the mean survival time of mice inoculated with samples from naturally infected animals is generally seven to ten days and five to seven days for Challenge Virus Standard (CVS strain)^{17,28}.

In the present study, the use of sucrose at 10% and 68% concentrations induced positive effects on the viral particles viability after washing/centrifugation protocols (T_0) to remove cryoprotectant agents and for a 30-days period of cryopreservation (T_{30}). Non-permeable or external cryoprotectants protective action is very complex and attributable to a number of properties, the most important of which is the beginning of the dehydration process. In particular, sucrose does not enter the cell, but exerts its beneficial effects by causing cellular dehydration through changes in osmotic pressure²⁹. It was suggested that the increase in the sucrose concentration generates an osmotic gradient across the cell membrane, which draws

water out of the cell, causing the cell to dehydrate sufficiently before and during the freezing procedure³⁰, also exerting a protective effect to the viral particles.

The results either demonstrate that after 30 days of freezing the viability of cryopreserved samples (using DMSO, GLY or PEG) was lower than the viability of fresh samples, but was similar to frozen controls. The viability of Rabies virus after cryopreservation without a cryoprotectant was significantly lower than that observed in the other treatments with almost all samples damaged following this procedure. As shown in this work, titration is an essential step in the evaluation of cryopreserved virus samples.

In conclusion, this study shows that cryopreservation of Rabies samples in sucrose allows the maintenance of Rabies virus immunofluorescent staining degree after a short-term cryopreservation of 30 days. Such results could stimulate further researches in this area. More experiments are needed to clarify the basic aspects of Rabies virus cryopreservation, mainly to obtain knowledge of fundamental cryobiological properties, which would minimize the injuries associated with the cryopreservation procedures. Other studies on the features of these cryoprotectant agents would provide new strategies to minimize such injuries and consequently reduce the inactivation of viral particles of Rabies virus stored samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), an agency linked to the Ministry of Science and Technology (MCT), by ceding of a scholarship to Edmara Chaves COSTA.

REFERENCES

1. Day JG, McLellan MR. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press; 1995.
2. Paoli DP. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiol Rev. 2005; 29: 897-910.
3. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003; 46: 205-229.
4. Wolfe J, Bryant G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. Int J Refrig. 2001; 24: 438-450.
5. Gould EA. Virus cryopreservation and storage. In: Day JG, McLellan MR. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press, 1995.

6. Schaefer JM. The viability of Rabies in carrion. Wildlife Damage Management, Internet Center for Great Plains Wildlife Damage Control. University of Nebraska – Lincoln 1983. [Acesso em 20 de agosto de 2010]. Disponível em: [<http://digitalcommons.unl.edu/gpawdcwp/288/>].
7. Valentini EJG, Albas A, Augusto VLM, Ito FH. Imunofluorescência realizada em cérebros de camundongos infectados com vírus rábico – cepa CVS, em diferentes estágios de decomposição. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1991; 33(3): 181-186.
8. Albas A, Ferrari CIL, Silva LHQ, Bernardi F, Ito FH. Influência da decomposição do cérebro de cães no diagnóstico laboratorial da Raiva. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(1):19-22.
9. David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. Vet Microbiol. 2002; (87): 111-118.
10. Biswal M, Ratho R, Mishra B. Usefulness of reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of Rabies RNA in archival samples. J Infect Dis. 2007; 60: 298–299.
11. Lopes MC, Venditti LLR, Queiroz LH. Comparison between RT-PCR and mouse inoculation test for detection of Rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. J Virol Methods. 2010; 164: 19-23.
12. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. Mutat Res. 2003; 543: 217–234.
13. Paynter SJ. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. Brain Res Bull. 2008; 75: 1-14.
14. Howell CL, Miller MJ. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. J Clin Microbiol. 1983; 3: 658-662.
15. Marconi MA, Lakatos EM. Técnicas de pesquisa: planejamento e execução de pesquisas, amostragens e técnicas de pesquisa, elaboração, análise e interpretação de dados. São Paulo: Atlas; 2006.
16. Coulon P, Derbin C, Kucera P, Lafay F, Prehaud C, Flamand A. Invasion of the Peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of Rabies virus and its avirulent derivative AvOl. J Virol. 1989; 63(8): 3550-3554.
17. Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. (Eds). Laboratory Techniques in Rabies, 4ªed. Geneva: World Health Organization, p.80-86; 1996.

18. Dorfman R. The detection of defective members of large populations. *Ann Math Statist.* 1943; 14(4): 436-440.
19. Marconi MA, Lakatos EM. Técnicas de pesquisa: planejamento e execução de pesquisas, amostragens e técnicas de pesquisa, elaboração, análise e interpretação de dados. São Paulo: Atlas; 2006.
20. Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Santos RR, Lucci CM, Nunes JF et al. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. *Small Rum Res.* 2005; 56: 103-111.
21. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg.* 1938; 27: 493-497.
22. Kuehne RW. Rapid determination of Log10 50% Lethal Doses or 50% Infective Doses. *J Clin Microbiol.* 1983; 17 (4): 702-703.
23. Dean DJ, Ableset MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*, 4^aed. Geneva: World Health Organization, p.88-95; 1996.
24. Roehe PM, Schaefer R, Pereira AS. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de Raiva. *Acta Sci Vet.* 2002; 30 (1): 53-57.
25. Bingham J, Merwe M. Distribution of Rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the Rabies fluorescent antibody test. *J Virol Methods.* 2002; 101: 85-94.
26. Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C, Papaneri A. The cell biology of Rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8: 51-61.
27. Wacharapluesadee S, Ruangvejvorachai P, Hemachuda T. A simple method for detection of Rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. *J Virol Methods.* 2006; 134: 267-271.
28. Marissol Cardoso Lopes* , Leandro Lima Rossignolo Venditti, Luzia Helena Queiroz. Comparison between RT-PCR and the mouse inoculation test for detection of Rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. *Journal of Virological Methods* 164 (2010) 19–23.
29. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod.* 2001; 16: 411–416.

30. Chen ZJ, Li M, Li Y, Zhao LX, Tang R, Sheng Y, Gao X, Chang CH, Feng HL. Effects of sucrose concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity. *Hum Reprod.* 2004; 10: 2345–2349.

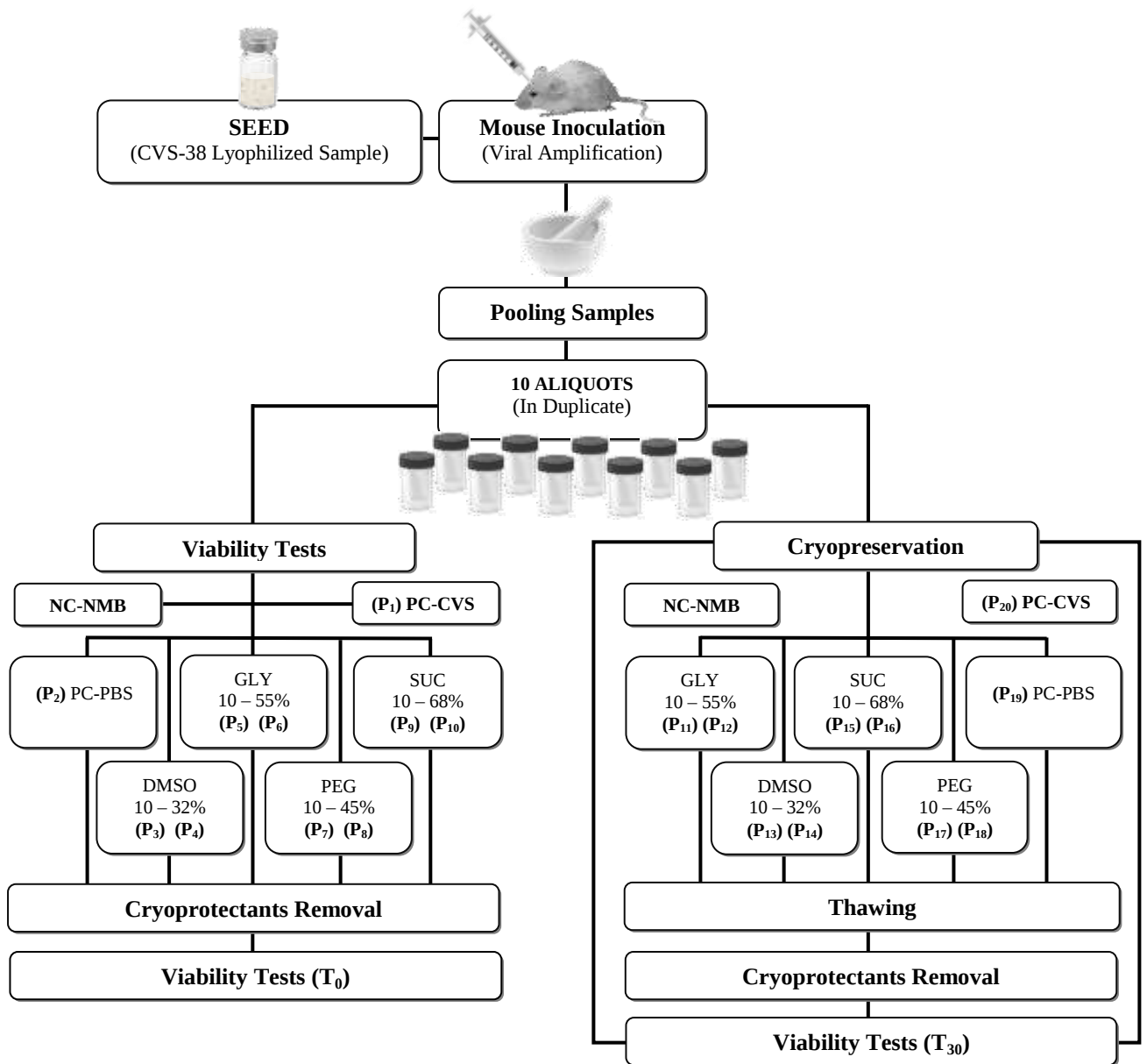


Figure 1. Flowchart showing the stages of experimental procedures

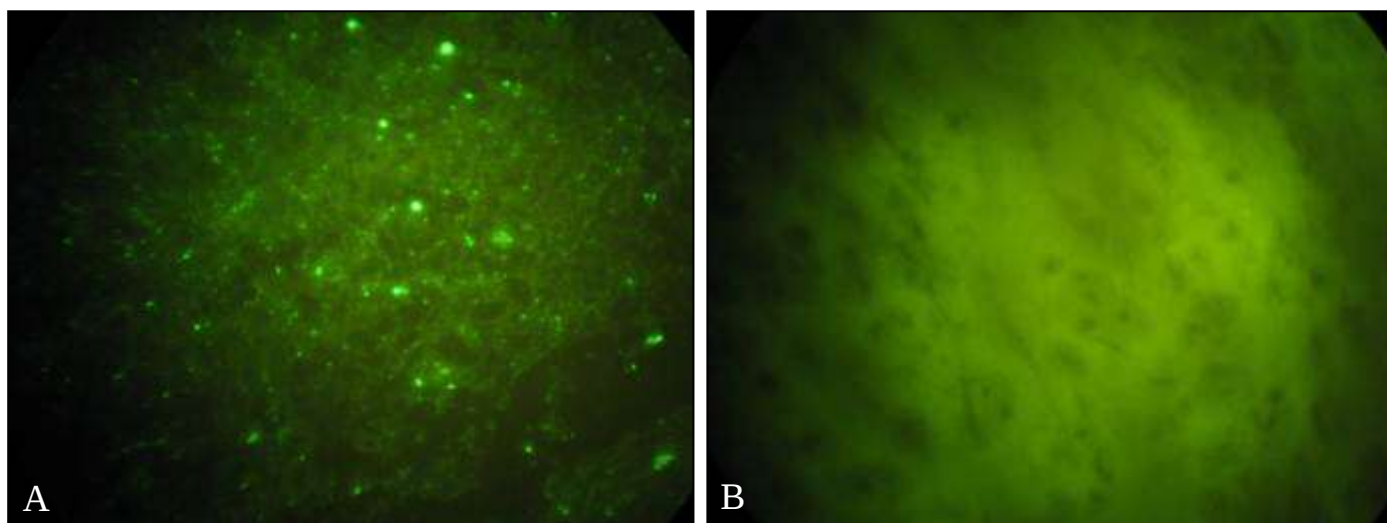


Figure 2. Photomicrograph with immunofluorescent staining of the samples impression smear shows bright apple-green viral nucleocapsid antigen targeted by the virus-specific fluorescent-labeled antibodies and seen using fluorescein isothiocyanate filter in a standard incident light ultraviolet microscope (Carl Zeiss, Germany), with x400 magnification. A, antigen very abundant in every field and amount per field was 'not possible to count' (++++): Positive Control - Challenge Virus Standard (PC-CVS); B, no antigen throughout whole impression (-): Negative Control - Normal Mice Brain (NC-NMB).

Table 1. Rabies virus titration by means of mice intracerebral inoculation

Samples	Number of affected mice at indicated dilution/Number tested						Log ₁₀ LD ₅₀
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
CVS-31 Seed	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	0/6	3.60
PC-CVS (T₀)	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	0/6	5.40
PC-CVS (T₃₀)	6/6	6/6	6/6	4/6	3/6	0/6	4.69

Table 2. Viability of Rabies virus infectious particles tested by mouse intracerebral inoculation and direct fluorescent antibody test after exposure to internal and external cryoprotectants

Samples	MIT ¹			FAT	
	MST ² (days)	Mortality		Results	Degree*
		NAM ³ /NT ⁴	%		
NC-NMB	21	0/11	0	Negative	—
PC-CVS	6.5	10/10	100	Positive	++++
PBS	7.0	10/10	100	Positive	+++
DMSO (10%)	7.0	10/10	100	Positive	+++
DMSO (32%)	7.0	10/10	100	Positive	++
GLY (10%)	7.0	11/11	100	Positive	+++
GLY (55%)	7.0	11/11	100	Positive	+++
PEG (10%)	7.0	10/10	100	Positive	+++
PEG (45%)	7.0	12/12	100	Positive	+++
SUC (10%)	6.8	10/10	100	Positive	++++
SUC (68%)	6.8	11/11	100	Positive	++++

¹Mouse Inoculation Test; ²Mean Survival Time; ³Number of Affected Mice;⁴Number Tested;

*Evaluation of positivity degree: —, +, ++, +++, +++++.

Table 3. Effects of freezing and storage temperature on Rabies virus viability tested by mouse intracerebral inoculation and direct fluorescent antibody test after a 30 days period

Samples	MIT ¹			FAT	
	MST ² (days)	Mortality		Results	Degree*
		NAM ³ /NT ⁴	%		
NC-NMB	21	0/10	0	Negative	—
PC-CVS	7.8	10/10	100	Positive	+++
PBS	7.0	10/10	100	Positive	+++
DMSO (10%)	6.9	10/10	100	Positive	+++
DMSO (32%)	7.0	10/10	100	Positive	++
GLY (10%)	7.0	10/10	100	Positive	+++
GLY (55%)	6.9	10/10	100	Positive	+++
PEG (10%)	6.7	10/10	100	Positive	+++
PEG (45%)	7.0	10/10	100	Positive	+++
SUC (10%)	7.0	10/10	100	Positive	++++
SUC (68%)	7.0	10/10	100	Positive	++++

¹Mouse Inoculation Test; ²Mean Survival Time; ³Number of Affected Mice;⁴Number Tested;

*Evaluation of positivity degree: —, +, ++, +++, +++++.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- Após 30 dias de congelação, a intensidade da fluorescência (IFD) das amostras criopreservadas (controles e amostras associadas a DMSO, GLI e PEG) foi inferior (+++) a observada em amostras frescas (+++), denunciando o comprometimento da viabilidade viral, provavelmente por inativação de partículas virais nas amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso estocadas à temperatura de -20°C;
- A criopreservação a -20°C demonstrou ser uma técnica limitada no que diz respeito à conservação de amostras de vírus da Raiva em tecido nervoso, em função do comprometimento da viabilidade viral das amostras mesmo em protocolos de 30 dias de estocagem (conservação de curto-prazo). Contudo, esses achados não inviabilizam sua aplicabilidade, devendo-se ponderar sobre seu uso mediante uma avaliação prévia dos objetivos estabelecidos para a estocagem do espécime, bem como do seu custo-benefício, por se tratar de uma tecnologia de criopreservação de baixo custo, simples e acessível;
- O uso da sacarose nas concentrações de 10% ou 68% produziu um efeito conservante nas amostras criopreservadas a -20°C, possibilitando a manutenção da fluorescência (++++) após a criopreservação das amostras por 30 dias.

Perspectivas da Tese

PERSPECTIVAS DA TESE

Faz-se necessário a execução de um maior número de estudos sobre os aspectos básicos da criopreservação de amostras do vírus da Raiva, principalmente no que tange a ampliação dos períodos de criopreservação, diversificação dos tipos de temperatura e de crioprotetores utilizados, bem como, dos testes de viabilidade pela inclusão de técnicas moleculares. Sugere-se, ainda, a transposição dos testes *in vivo* (isolamento viral em camundongos) para seus equivalentes *in vitro* (isolamento viral em cultivo celular), além da instituição da titulação viral em todos os protocolos de avaliação da viabilidade viral.

Referências

REFERÊNCIAS¹

- ACKER, J. P.; MCGANN, L. E. Protective effect of intracellular ice during freezing? **Cryobiology**, v.46, p.197-202, 2003.
- ALBAS, A.; FERRARI, C. I. L.; SILVA, L. H. Q.; BERNARDI, F.; ITO, F. H. Influência da decomposição do cérebro de cães no diagnóstico laboratorial da Raiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n. 1, p.19-22, 1999.
- ALLSOPP, T. E.; FAZAKERLEY, J. K. Altruistic cell suicide and the specialized case of the virus-infected nervous system. **Trends in Neuroscience**, v.23, n.7, p.284-90, 2000.
- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFES – Universidade Federal de São Paulo, 2004.
- ARAI, Y. T.; KUZMIN, I. V.; KAMEOKA, Y.; BOTVINKIN, A. D. New lissavírus genotype from the Lesser Mouse-eared Bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. **Emerging Infectious Disease**, v.9, n.3, p.333-337, 2003.
- ARAÚJO, D. B.; LANGONI H.; ALMEIDA M. F.; MEGID J. Heminested reverse-transcriptase polymerase chain reaction (hnRT-PCR) as a tool for rabies virus detection in stored and decomposed samples. **BMC Research Notes**, v.1, n.17, 2008.
- BADRANE, H.; BAHLOUL, C.; PERRIN, P.; TORDO, N. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. **Journal of Virology**, v.75, p.3268-3276, 2001.
- BADRANE, H.; TORDO, N. Host switching in *Lyssavirus* history from the chiroptera to the **carnivora orders**. *Journal of Virology*, v.75, n.17, p.8096-8104, 2001.
- BAER, G. M.; CLEARY, W. F. A model in mice for the pathogenesis and treatment of Rabies. **Journal of Infectious Diseases**, v.125, p.520-527, 1972.
- BAER, G. M.; LENTZ, T. L. Rabies Pathogenesis to the Central Nervous System. In: BAER, G.M. ed. **The natural history of Rabies**. 2 ed. Boston: CRC Press, 1991, p.105-120.
- BINGHAM, J.; MERWE, M. van der. Distribution of Rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the Rabies fluorescent

¹ NBR6023 – AGOSTO/2002 (ABNT)

antibody text. **Journal of Virological Methods**, v. 101, p. 85-94, 2002.

BISWAL, M.; RATHO, R.; MISHRA, B. Usefulness of reverse transcriptase polymerase chain reaction for detection of Rabies RNA in archival samples. **Journal of Infectious Diseases**, v. 60, p. 298–299, 2007.

BLACK, E. M.; McELHINNEY, L. M.; LOWINGS, J. P.; SMITH, J.; JOHNSTONE, P.; HEATON, P. R. Molecular methods to distinguish between classical Rabies and the Rabies-related European bat lyssaviruses. **Journal of Virological Methods**, v.87, n.1-2, p.123-131, 2000.

BOURHY, H.; KISSI, B.; TORDO, N. Molecular diversity os *Lyssavirus* genus. **Virology**, v.194, p.70-81, 1993.

BOURHY, H; SUREAU, P. **Laboratory methods for Rabies diagnosis**. Paris: Institute Pasteur, 1991. 197 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP. Resolução 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, 1996.

BRASS, D. A. Rabies and Rabies-related viruses of Africa. In: ____ **Rabies in bats. Natural history and public health implications**. Connecticut: Livia Press, 1994, p.263-273.

BUNSCHOTEN, H.; KLAPMUTS, R. J.; CLAASSEN, I. J. T. M.; REYNEVELD, S. D.; OSTERHAUS, ALBERT D. M. E.; UYTDEHAAG, F. G. C. M. Rabies virus-specific human T-cell clones provide help for an “in vitro” antibody response against neutralizing antibody-inducing determinants of viral glycoprotein, **Journal of General Virology**, v.70, p.1513-1521, 1989.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J. WHITTINGHAM, D. G. Effect of Cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.11-19, 1997.

CÁNOVAS, M.; IBORRA, J. L. Culture collections and biochemistry. **International Microbiology**, v.6, p.105-112, 2003.

CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturação de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.2, p.423-432, 2000.

CARVALHO, F. de. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da

água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v.31, n.3, p.814-820, 2007.

CARVALHO, T. H. F. de; LOPES, O. U. O emprego de camundongo geneticamente modificado como modelo de estudo para doenças cardiovasculares. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.39, n.1, p.110-116, 2006.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Infectious Diseases [on line]. Atlanta, USA; 2006. [Acesso em: 20 dez. 2008] Disponível em: [<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/rabies>]

CECCALDI, P. E.; FILLION, M. P.; ERMINE, A.; TSIANG, H.; FILLION, G. Rabies virus selectively alters 5-HT1 receptor subtypes in rat brain. **European Journal of Pharmacology**, v.245, n.2, p.129-138, 1993.

CHARLTON, K. M. The pathogenesis of Rabies. In:_____. **Rabies**. Campbell J.B. & Charlton K.M. (Eds.). Boston: Kluwer Academic Publishers, 1988, p.101-150.

CHEN, Z. J.; LI, M.; LI, Y.; ZHAO, L. X.; TANG, R.; SHENG, Y.; GAO, X.; CHANG, C. H.; FENG, H. L. Effects of sucrose concentration on the developmental potential of human frozen-thawed oocytes at different stages of maturity. **Human Reproduction**, v. 10, p.2345–2349, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Legislação & ética. São Paulo [2004?]. [Acesso em: 24 set. 2007] Disponível em: [<http://www.cobea.org.br>].

COLLIER, L.; OXFORD, J. **Human virology**: A text for students of medicine, dentistry and microbiology. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2000.

CONSALES, C. A.; BOLZAN, V. L. Rabies review: immunopathology, clinical aspects and treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxin Including Tropical Diseases**, v.13, p.5-38, 2007.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Doenças infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2. ed. São Paulo: Ed. Medsi , 1992 . 823 p.

COSTA, W. A.; ÁVILA, C. A.; VALENTINE, E. J. G.; REICHMANN, M. L. A. B. CUNHA, R. S.; GUIDOLIN, R.; PANACHÃO, M. R. I.; OMOTO, T. M. BOLZAN, V. L. **Profilaxia da Raiva Humana**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000.

COULON, P.; DERBIN, C.; KUCERA, P.; LAFAY, F.; PREHAUD, C.; FLAMAND, A. Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of Rabies virus

and its avirulent derivative AvOl. **Journal of Virology**, v.63, n.8, p.3550-3554, 1989.

CREPIN, P.; AUDRY, L.; ROTIVEL, Y. Intravital diagnosis of human Rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.117, p.1117-1121, 1998.

CTBio – FIOCRUZ. **Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2005.

DANTAS JÚNIOR, J. V. Análise molecular de vírus da Raiva circulante no Estado do Rio de Janeiro, entre 1999 e 2004. 2006. 70p. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2006.

DANTAS JÚNIOR, J. V.; KIMURA, L. M. S.; FERREIRA, M. S. R.; FIALHO, A. M.; ALMEIDA, M. M. S.; GRÉGIO, P. C.; ROMIJN, P. C.; LEITE, J. P. G. Reverse transcription polymerase chain reaction assay for Rabies virus detection. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.398-400, 2004.

DAVID, D.; YAKOBSON, B.; ROTENBERG, D.; DVERES, N.; DAVIDSON, I.; STRAM, Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p.111-118, 2002.

DAWSON, M. Initiation and maintenance of cultures. In: BUTLER, M.; DAWSON, M. eds. **Cell Culture Labfax**. Oxford: Academic Press, 1992.

DAY, J. G.; McLELLAN, M. R. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995.

DEAN, D.J.; ABELSET, M. K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in Rabies**, 4ed. Geneva: World Health Organization, p.88-95, 1996.

DELAGNEAU, J. F.; PERRIN, P.; ATANASIU, P. Structure of Rabies virus: spatial relationships of the proteins G, M1, M2 and N. **Annales de l'Institut Pasteur - Virologie**, v.132E, p.473-493, 1981.

DIETZSCHOLD, B.; RUPPRECHT, C.E.; FU, Z.F.; KOPROWSKI, H. Rhabdoviruses. In: FIELD, B.N.; KNEPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virology**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1137-1159.

DIETZSCHOLD, B.; WIKTOR, T. J.; TROJANOWSKI, J. Q.; MACFARLAN, R. I.;

WUNNER, W. H.; ANJEL, M. J. T.; KOPROWSKI, H. Differences in cell to cell spread of pathogenic and apathogenic Rabies virus in vivo and in vitro. **Journal of Virology**, v.56, n.1, p.12-18, 1985.

DIMMOCK, N. J.; EASTON, A. J.; LEPPARD, K. N. **Introduction to Modern Virology**. 6.ed. Blackwell Publishing, 2007.

DORFMAN, R. The detection of defective members of large populations. **The Annals of Mathematical Statistics**, v.14, n.4, p.436-440, 1943.

DULBECCO, R.; GINSBERG, H. S. Os rabdovirus. In: _____. **Microbiologia de Davis**. 2. ed. São Paulo: Ed. Harbra, v. 4, 1980. p.1623-1633.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.268-272, 2004.

DUMRONGPHOL, H.; SRIKIATKHACHORN, A.; HEMACHUDHA, T.; KOTCHABHAKDI, N.; GOVITRAPONG, P. Alteration of muscarinic acetylcholine receptors in Rabies viralinfected dog brains. **Journal of the Neurological Sciences**, v.137, n.1, p.1-6, 1996.

FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; ROCCHETTA, G.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. **Human Reproduction**, v.16, p.411-416, 2001.

FAZAKERLEY, J. K.; ALLSOPP, T. E. Programmed cell death in virus infections of the nervous system. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.253, p.95-119, 2001.

FENNER, F. J.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: _____. **Veterinary Virology**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 213-239.

FENNER, R.; BACHMANN, P.A.; GIBBS, E.P.; MURPHY, F.A.; STUDDERT, M.J.; WHITE, D.O. **Virologia Veterinária**, Zaragoza: Acribia, 1992. p.551-556.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v.63, n.1/2, p.73-82, 2001.

FOOKS, A. R. The challenge of new and emerging lyssaviruses. **Expert Review of Vaccines**, v.3, n.4, p.333-336, 2004.

FRANCKI, R. I. B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L.; BROWN, F. Classification and

nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, Suppl. 2, p.228-229, 1991.

FRASER, G.C.; HOOPER, P.T.; LUNT, R.A.; Gould, A.R.; GLEESON, L.J.; HYATT, A.D.; RUSSEL, G.M.; KATTENBELT, J.A. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, n.2, p.327-331, 1996.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in frozen state. **Cryo Letters**, v.25, n.6, p.375-388, 2004.

GAUDIN, Y.; RUIGROK, R. W.; KNOSSOW, M.; FLAMAND, A. Low-pH conformational changes of Rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. **Journal of Virology**, v.67, p.1365-1372, 1993.

GERMANO, P. M. L.; MIGUEL, O.; ISHIZUKA, M. M.; SILVA, E. V. Avaliação de três cepas do vírus rábico, antigenicamente distintas, em camundongos. II-Estudo da disseminação viral por diferentes órgãos. **Revista de Saúde Pública**, v.22, n.6, p.473-478, 1988.

GONÇALVES, J. L. S.; VON HUBINGER, M. G.; WERMELINGER, M. C. M. W. Vírus da Raiva. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**, Guanabara Koogan, 1ª ed., 2002. p.157-164.

GOULD, A. R.; HYATT, A. D.; LUNT, R.; KATTENBELT, J. A.; HENSGSTBERGER, S.; BLACKSELL, S.D. Characterization of a novel *Lyssavirus* isolated from *Pteropid* bats in Australia. **Virus Research**, v.54, n.2, p.165-187, 1998.

GOULD, E. A. Methods for long-term virus preservation. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v.13, p.57-66, 1999.

GOULD, E. A. Virus cryopreservation and storage. In: DAY, J. G.; McLELLAN, M. R. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995.

HEATON, P. R.; JOHNSTONE, P.; McELHINNEY, L. M.; COWLEY, R.; O'SULLIVAN, E.; WHITBY, J. E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of Rabies and Rabies-related viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p.2762-2766, 1997.

HEINEMANN, M. B.; MATIOLI, F. M. C. F.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; SAKAMOTO, S. M.; BERNARDI, F.; ITO, F. H.; MADEIRA, A. M. B. N.; RICHTZENHAIN, L. J. Genealogical analyses of Rabies virus strains from Brazil base don N gene alleles. **Epidemiology and Infection**, v.128, n.3, p.503-511, 2002.

HEMACHUDHA, T.; LAOTHAMATAS, J.; RUPPRECHT, C. E. Human Rabies: a disease

of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 101-109, 2002.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**, v.543, p.217-234, 2003.

HOWELL, C. L.; MILLER, M. J. Effect of sucrose phosphate and sorbitol on infectivity of enveloped viruses during storage. **Journal of Clinical Microbiology**, v.3, p.658-662, 1983.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p.205-229, 2003.

JACKSON, A.L. Rabies pathogenesis update. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.1, p.167-172, 2010.

JACOB, Y.; BADRANE, H.; CECCALDI, P. E.; TORDO, N. Cytoplasmic Dynein LC8 interacts with lyssavirus phosphoprotein. **Journal of Virology**, v.74, p.10217-10222, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

KAPLAN, C.; TURNER, G. S.; WARREL, D. A. **Rabies, the facts**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1986. p. 8-74.

KAWAI, A.; MORIMOTO, K. Functional aspects of *Lyssavirus* proteins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.187, p.27-42, 1994.

KELLY, R. M.; STRICK, P. L. Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, v.103, n.1, p.63-71, 2000.

KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cultured cells**. 2.ed. London: Academic Press, 1991.

KISS, B., TORDO, N.; BOURHY, H. Genetic polymorphism in the Rabies virus nucleoprotein gene. **Virology**, v.209, p.526-537, 1995.

KOPROWSKI, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in Rabies**, 4ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.80-86.

KUEHNE, R.W. Rapid determination of Log10 50% Lethal Doses or 50% Infective Doses.

Journal of Clinical Microbiology, v.17, n.4, p.702-703, 1983.

KUZMIN, I. V.; HUGHES, G. J.; BOTVINKIN, A. D.; ORCIARI, L. A.; RUPPRECHT, C. E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the *Lyssavirus* genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lissavírus genotype definition. **Virus Research**, v.111, n.1, p.28- 43, 2005.

KUZMIN, I. V.; ORCIARI, L. A.; ARAI, Y. T.; SMITH, J. S.; HANLON, C. A.; KAMEOKA, Y.; RUPPRECHT, C. E. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. **Virus Research**, v.97, n.2, p.65-79, 2003.

LARGHI, O.; OUBIÑA, J. R. Família Rhabdoviridae. In: CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J. R. **Virologia Médica**. 3. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1998. p. 245-260.

LENTZ, T. L.; BURRAGE, T. G.; SMITH, A. L.; CRICK, J.; TIGNOR, G. H. Is the acetylcholine receptor a Rabies virus receptor? **Science**, v.215, n.4529, p.182-184, 1982.

LOPES, M. C.; VENDITTI, L. L. R.; QUEIROZ, L. H. Comparison between RT-PCR and mouse inoculation test for detection of Rabies virus in samples kept for long periods under different conditions. **Journal of Virological Methods**, v.164, p.19-23, 2010.

LYCKE E, TSIANG H. Rabies virus infection of cultured rat sensory neurons. *Journal of Virology*, v.61, n.9, p.2733-2741, 1987.

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. **Técnicas de pesquisa: planejamento e execução de pesquisas, amostragens e técnicas de pesquisa, elaboração, análise e interpretação de dados**. São Paulo: Atlas, 2006.

MENDEZ, J.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; CONTRERAS, K.; MOOIJMAN, K.; ARAUJO, R. Conservation of phage reference material and water samples containing bacteriophages of enteric bacteria. **Journal of Virological Methods**, v. 106, p. 115-124, 2002.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. **Cryobiology**, v.8, p.173-183, 1971.

MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in Rabies**, 4ed. Geneva: World Health Organization, 1996.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Laboratórios de diagnóstico da Raiva (versão março de 2008 Brasil)**. [Acesso em: 20 jun. 2008] Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/PROGRAMAS/AREA_ANIMAL/CRHE/PNCRH/LABORA

T%D3RIOS%20DE%20DIAGN%D3STICO%20DA%20RAIVA%20VERS%C3O%20 FEV EREIRO%202008_CGAL_0.PDF]

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico laboratorial da Raiva**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006.

MORRIS, G. J.; GOODRICH, M.; ACTON, E.; FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. **Cryobiology**, v.52, p.323-334, 2006.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells agein damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN, H. T. **Cryobiology**. London-New York: Academic Press, 1966.

OLIVEIRA, V. M. de; SETTE, L. D.; FANTINI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência**, v.7, p.1-19, 2006.

OLSON, M. R.; AXLER, R. P.; HICKS, R. E. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. **Journal of Virological Methods**, v.122, p.147-152, 2004.

PAIVA, F. P. de; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Salvador: FIOCRUZ, 2005.

PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.897-910, 2005.

PARK, C.; KONDO, M.; INOUE, S.; NOGUCHI, A.; OYAMADA, T.; YOSHIKAWA, H.; YAMADA, A. The Histopathogenesis of Paralytic Rabies in Six-Week-Old C57BL/6J Mice Following Inoculation of the CVS-11 Strain into the Right Triceps Surae Muscle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n.6, p.589-595, 2006

PAYNTER, S. J. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. **Brain Research Bulletin**, v.75, p.1-14, 2008.

PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.5-13, 2002.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

PREHAUD, C., LAY, S., DIETZSCHOLD, B. & LAFON, M. Glycoprotein of nonpathogenic Rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis. **Journal of**

Virology, v.77, p.10.537–10.547, 2003.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 3 ed. Boston: Wm. C. Brown Publishers, 1996.

REED, L. J.; MÜENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; LUCCI, C. M.; NUNES, J. F.; FIGUEIREDO, J. R. Cryopreservation and short-term culture of isolated caprine primordial follicles. **Small Ruminant Research**, v.56, p.103-111, 2005.

ROEHE, P. M.; SCHAEFER, R.; PEREIRA, A. da S. Otimização da imunofluorescência direta para diagnóstico de Raiva. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.1, p.53-57, 2002.

ROUQUAYROL, M. Z.; FILHO, N. de A. **Epidemiologia & Saúde**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003.

RUPPRECHT, C. E.; HANLON, C. A.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.327-343, 2002.

SCHAEFER, J. M. The viability of Rabies in carrion. Wildlife Damage Management, Internet Center for Great Plains Wildlife Damage Control. University of Nebraska – Lincoln 1983. [Acesso em 20 ago. 2010]. Disponível em: [<http://digitalcommons.unl.edu/gpawdcwp/288/>].

SCHNEIDER, L. G.; DIRINGER, H. Structure and molecular biology of Rabies virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.75, p.153-180, 1976.

SCHNELL, M. J.; MCGETTIGAN, J. P.; WIRBLICH, C.; PAPANERI, A. The cell biology of Rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.51-61, 2010.

SHIMIZU, K.; ITO, N.; MITA, T.; YAMADA, K.; HOSOKAWA-MUTO, J.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of Rabies virus in virulence for adult mice. **Virus Research**, v.123, n.2, p.154-160, 2007.

SHOPE, R. E.; MURPHY, F. A.; HARRISON, A. K.; CAUSEY, O. R.; KEMP, G. E.; SIMPSON, D. I.; MOORE, D. L. Two African viruses serologically and morphologically related to Rabies virus. **Journal of Virology**, v.6, p.690-692, 1970.

SMITH, D. Culture collections over the world. **International Microbiology**, v.6, p.95-100, 2003.

SMITH, J. S. New aspects of Rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis and prevention of the disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.2, p.166-176, 1996.

SOKOL, F.; STANCEK, D.; KOPROWSKI, H. Structural proteins of Rabies virus. **Journal of Virology**, v.7, p.241-249, 1971.

SU, S. C.; GARBERS, S.; RIEPER, T. D. TONIOLO, P. Temperature variations in upright mechanical freezers. **Cancer Epidemiologic Biomarkers**, v.5, p.139-140, 1996.

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; SCHACHNER, M.; HARTMANN, U.; CREMER, H.; LAFON, M. The neural cell adhesion molecule is a receptor for Rabies virus. **Journal of Virology**, v.72, p.7181-7190, 1998.

THOULOZE, M. I.; LAFAGE, M.; YUSTE, V. J.; KROEMER, G.; SUSIN, S. A.; ISRAEL, N.; LAFON, M. Apoptosis inversely correlates with Rabies virus neurotropism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1010, p.598-603, 2003.

TORDO, N. Characteristics and molecular biology of Rabies virus. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in Rabies**, 4ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.28-51.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Walking along the Rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.83, p.3914-3918, 1986.

TORDO, N.; POCH, O.; ERMINE, A.; KEITH, G.; ROUGEON, F. Completion of the Rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negativestand RNA-viruses. **Virology**, v.165, p.565-576, 1988.

TRIMARCHI, C. V.; RUDD, R. D.; SAFFORD JUNIOR, M. An in vitro virus neutralization test for Rabies antibody. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds). **Laboratory Techniques in Rabies**, 4ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p.80-86.

TSIANG, H. Rabies virus infection of myotubes and neurons as elements of the neuromuscular junction. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p.S733-S738, 1988.

TSIANG, H.; CECCALDI, P. E.; LYCKE, E. Rabies virus infection and transport in human

- sensory dorsal root ganglia neurons. **Journal of General Virology**, v.72, p.1191-1194, 1991.
- TYLER, K. L.; NATHANSON, N. Pathogenesis of viral infections. In: FIELDS, B. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Associate Editors). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- URUBURU, F. History and services of culture collections. **International Microbiology**, v.6, p.105-112, 2003.
- VALENTINI, E. J. G.; ALBAS, A.; AUGUSTO, V. L. M.; ITO, F. H. Imunofluorescência realizada em cérebros de camundongos infectados com vírus rábico – cepa CVS, em diferentes estágios de decomposição. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, n.3, p.181-186, 1991.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M. H.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; RINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Family *Rhabdoviridae*. In: _____. **Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses**. Ed. Academic Press, 2000. p. 563-583.
- VIVAS, L. A. M.; JAMEL, N.; REFINETTI, R. A.; SILVA, L. F.; RODRIGUES, L. V.; SILVA, P. C.; SCHANEIDER, A. Anesthetic experimental device for small animal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.22, n.3, p.229-233, 2007.
- VYSEKANTSEV, I. P.; GURINA, T. M.; MARTSENYUK, V. F.; PETRENKO, T. F.; KUDOKOTSEVA, E. V.; KOSHCHIY, S. V.; GROSHEVOY, M. I. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. **Cryo Letters**, v.26, n.6, p.401-408, 2005.
- WACHARAPLUESADEE, S.; RUANGVEJVORACHAI, P.; HEMACHUDA, T. A simple method for detection of Rabies viral sequences in 16-year old archival brain specimens with one-week fixation in formalin. **Journal of Virological Methods**, v.134, p.267-271, 2006.
- WAGNER, R.; ROSE, J. K. Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Associate Editors). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- WHITE, D. O.; FENNER, F. J. **Medical Virology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1994.
- WOLDEHIWET, Z. Clinical laboratory advances in the detection of Rabies virus. **Clinica**

Chimica Acta, v.351, p.49-63, 2005.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001.

WUNNER, H. W. Rabies Virus. In: JACKSON, C. A.; WUNNER, H. W. **Rabies**. New York: Academic Press, 2002. p.23-77.

WUNNER, W. H. The chemical composition and molecular structure of Rabies virus. In: BAER, G. M. (Ed.). **The natural history of Rabies**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 31-37.

XAVIER, S. de M. **Comparação dos métodos de inoculação intracerebral em camundongos (*Mus musculus*) e de inoculação em cultura de células BHK-21 (C13) no diagnóstico da Raiva**. 2005. 84p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

ZACHARY, J. F. Nervous System. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th St. Louis: Mosby, 2007. Cap.14, p.833-971.

ZANETTI, C. R.; FRANCO, M. T.; VASSÃO, R. C.; PEREIRA, C. A.; PEREIRA, O. A. C. Failure of protection induced by a Brazilian vaccine against Brazilian wild Rabies viruses. **Archives of Virology**, v.143, p.1745-1756, 1998.

Anexos

ANEXO I

(Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa)



Universidade Estadual do Ceará
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi – CEP: 60740-000 Fortaleza-Ceará
Fone: 3101 9890 e-mail:cep@uece.br

Fortaleza (CE), 08 de outubro de 2008

Título: “Conservação de amostras de vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação”. **Processo** 08352394-4 **FR:** 214404

Nome: Edmara Chaves Costa (Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - UECE)

Orientadora: Dra. Maria de Fátima da Silva Teixeira (PPGCV/UECE)

Instituição onde se realizará a pesquisa: Laboratório de Virologia – PPGCV - UECE

PARECER

O projeto tem como objetivo avaliar diferentes protocolos de criopreservação a -20°C em amostras de vírus da raiva em serviços de diagnóstico e pesquisa de raiva. Os sujeitos da pesquisa serão profissionais responsáveis pelo setor de diagnóstico destas instituições, estabelecendo-se uma amostra não probabilística do tipo intencional. Os critérios de inclusão serão a atuação no setor e a concordância em participar da pesquisa. O instrumento de coleta de dados será um questionário semi-estruturado (apresentado em anexo). Este questionário passará por um pré-teste, aplicado em cinco profissionais de saúde pública veterinária (informantes-chave), para a identificação de falhas metodológicas possíveis de existir neste tipo de instrumento. Os resultados definitivos serão apresentados na forma de gráficos e tabelas. A parte do projeto cuja avaliação é da competência do CEP-UECE não apresenta riscos. O protocolo atende a todas as exigências, e anexa todos os documentos necessários à aprovação desta parte do projeto (folha de rosto, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, cronograma de atividades, orçamento detalhado e currículos disponíveis na plataforma Lattes). A planilha de custos apresenta informa que o mesmo será financiado pela doutoranda e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através de recursos de Taxa de Bancada. O corrente processo apresenta adequadamente a identificação do responsável pela pesquisa e a anuência da instituição promotora.

O projeto está bem estruturado e é relevante havendo retorno para comunidade. O projeto no que se refere à pesquisa envolvendo seres humanos atende aos ditames da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde-CNS e, portanto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará – CEP-UECE.

Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa- UECE

ANEXO II

(Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Comitê de Ética para o Uso de Animais
Av. Paranjana, 1700 - Itaperi
CEP 60740-903 - fone: 3101-9890
Email: ceua_uece@yahoo.com.br



PARECER

PROCESSO N°: 08185881-7

TÍTULO: "Conservação de amostras do vírus da raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação".

PRINCIPAL PESQUISADOR: Maria Fátima da Silva Teixeira (FAVET – UECE)

FORMAÇÃO: Médica-Veterinária

DOCUMENTOS: Ofício de encaminhamento; Termo de compromisso; Cronograma de execução; Orçamento; Currículo Lattes do pesquisador principal.

O projeto está bem relatado e apresentado, contendo informações técnicas de acordo com o estado atual da matéria que fazem parte do capítulo de introdução.

O capítulo "material e métodos" encontra-se com detalhamento.

A proposta contempla os requisitos necessários de acordo com o Comitê de Ética para o Uso Animal e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Consideramos que apesar da possibilidade de utilização de linhagens celulares, a situação está distante da realidade brasileira.

Os aspectos relacionados com a Biossegurança devem ser avaliados por Comitê competente e legalmente constituído.

Os objetivos propostos estão claros e coerentes, o que nos permite enquadrá-lo, no que diz respeito aos aspectos éticos e legais para o uso de animais na categoria de Aprovado.

Fortaleza, 23 de janeiro de 2009.


José Mário Girão Abreu
Presidente CEUA-UECE

ANEXO III

(Comprovante de Aceite do Capítulo I)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi
CEP: 60740-000 Fortaleza-Ceará
Fone: (0xx85) 31019850 Fax: (0xx85) 31019855

COMUNICAÇÃO DE ACEITE

O corpo editorial da Revista **Ciência Animal** (ISSN 0104-3773) comunica que o artigo intitulado: **“PRINCÍPIOS DA ESTOCAGEM E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS”**, tendo como autores: EDMARA CHAVES COSTA, MARIA FÁTIMA DA SILVA TEIXEIRA, TÂNIA VALESKA MEDEIROS DANTAS, VALESKA SHELDA PESSOA DE MELO, SUZANA APARECIDA COSTA ARAÚJO, BENEDITO NEILSON ROLIM foi aceite para publicação em 2009.

Atenciosamente,

Fortaleza, 30 de agosto de 2010


Professora Janaina Serra Azul Monteiro Evangelista

Editora Chefe

Apêndices

APÊNDICE I

(Métodos e Técnicas)

FASE EXPLORATÓRIA

Realizou-se uma pesquisa do tipo exploratório-descritiva e transversal. Foram identificadas instituições nacionais especializadas no diagnóstico, pesquisa, controle e prevenção da Raiva, de caráter público, tomando-se por base os dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura (2008). O contato com os estabelecimentos identificados ocorreu por meio de visitas, comunicação via fax, endereço eletrônico e/ou correio (carta registrada).

Os participantes da pesquisa foram profissionais responsáveis (informantes-chave) pelo setor de diagnóstico, pesquisa e/ou controle e prevenção da Raiva nas instituições selecionadas, estabelecendo-se uma amostra não probabilística do tipo intencional. Os critérios de inclusão dos participantes compreenderam a atuação no setor de interesse e a concordância em tomar parte da pesquisa, enquanto o critério de exclusão baseou-se na discordância à participação.

O instrumento de investigação foi o questionário semi-estruturado constituído por perguntas sobre os protocolos e rotinas empregadas na preservação das amostras de vírus da Raiva, tempo e objetivo da estocagem, tipos de amostras preservadas, equipamentos utilizados etc. Durante o mês de junho de 2008, o questionário passou pelo pré-teste, visando-se identificar falhas metodológicas passíveis de existir nesse tipo de instrumento.

O pré-teste foi executado com cinco profissionais da área de saúde pública veterinária. Após a tabulação, o questionário foi reformulado, “tendo em vista o seu aprimoramento e o aumento de sua validade” (MARCONI e LAKATOS, 2006, p.100). As informações obtidas foram compiladas em um banco de dados e processadas no programa estatístico SPSS versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos), sendo os resultados agrupados na forma de gráficos e tabelas para a realização de análise descritiva e inferencial dos elementos sobre investigação.

Cumprir evidenciar que o presente estudo incorporou os referenciais básicos da bioética, a qual configura os pressupostos da *autonomia*, *não-malificência*, *beneficência* e *justiça*, de observância obrigatória, nos casos de investigações de cunho científico cujos participantes sejam componentes humanos. Foi apresentado aos partícipes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, cujo teor abrangeu esclarecimentos a cerca da natureza da

pesquisa, voluntariedade da participação e garantia do sigilo concernente às informações coletadas.

Esse projeto de pesquisa passou pela apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Ceará (CEP/UECE), estando de acordo com as disposições da resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - CNS (BRASIL, 1996), responsável pela deliberação de diretrizes e normas aplicadas à pesquisa com seres humanos (protocolo nº 08352394-4).

FASE EXPERIMENTAL

1 Animais Experimentais

Os animais de escolha para a execução dos experimentos foram os camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) com idade aproximada de três a quatro semanas (10-16g) (Fig.1). Os animais foram empregados na produção de amostras destinadas à criopreservação e testes de viabilidade de vírus da Raiva.



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 1. Camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) com 21 dias de idade.

A separação dos grupos seguiu o padrão de amostragem probabilística do tipo aleatória simples, segundo o qual a escolha de um indivíduo, mediante uma população, é tida como ao acaso (aleatória) ao se partir do pressuposto de que cada componente da população será submetido à mesma probabilidade de ser escolhido (MARCONI e LAKATOS, 2006).

2 Manejo dos Animais

Os camundongos destinados aos experimentos foram confinados em gaiolas de polietileno na conformação quadrada grande (41cm x 34 cm x 16 cm) com capacidade para até 20 camundongos e/ou gaiolas pequenas (30cm x 20cm x 13cm) indicadas para até cinco camundongos adultos. Essas gaiolas apresentam tampas de ferro galvanizado, dotadas de comedouros (depressão para ração) e bebedouros apropriados (inclinação de 45°), sendo forradas com serragem de madeira de pinus esterilizada por irradiação (maravalha).

As gaiolas eram acomodadas nas prateleiras dispostas na sala do Biotério de Experimentação do Laboratório de Virologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará – LABOVIR/PPGCV/UECE (Fig.2). A mesma permanecia ambientada à temperatura média de 22°C ($\pm$ 2°C), com fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuridão controlado por ‘timer’ digital, sendo oferecido, aos animais, água tratada e ração comercial para roedores em sistema *ad libitum* conforme indicações de Paiva, Maffili e Santos (2005).



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 2. Gaiolas dispostas nas prateleiras do Biotério de Experimentação do Laboratório de Virologia.

Em todas as etapas da pesquisa envolvendo animais, foram respeitados os critérios de bioética no uso de animais de experimentação com ênfase no tratamento humanitário, minimizando a possibilidade da ocorrência de dor e desconforto, evitando-se o estresse excessivo, bem como, a utilização desnecessária desses animais (ANDERSEN et al., 2004; COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2004).

Por ocasião dos procedimentos de inoculação intracerebral das suspensões de vírus da Raiva, cada animal foi anestesiado com cetamina (dose de 100 a 150mg/kg, Ketalar[®] Parke-Davis – 50mg/mL) associado à xilazina (dose de 10 a 15mg/kg, Rompum[®] Bayer – 20mg/mL) por via intraperitoneal² (IP), com período de latência de cinco minutos e intervalo hábil de 60 a 100 minutos como descrito por Paiva, Maffili e Santos (2005).

Subseqüentemente, foram instituídos protocolos para o uso de anestésicos inalatórios. Os mesmos foram preferidos por permitirem excelente controle da profundidade da anestesia. Fez-se a seleção dos agentes halotano ou isoflurano para a realização dos procedimentos de inoculação. Inicialmente, o animal era colocado em uma câmara anestésica (adaptada) (Fig.3) e depois, durante o processo, o estado anestésico era mantido pelo emprego de uma máscara inalatória (que pode ser confeccionada a partir de uma seringa de 10mL cortada e enfaixada com esparadrapo). Os anestésicos inalatórios têm sido vastamente empregados em procedimentos de curta duração devido à sua rápida indução e curto tempo de recuperação (CARVALHO e LOPES, 2006; VIVAS et al., 2007).



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 3. Halotano e câmara anestésica (adaptada).

Segundo Paiva, Maffili e Santos (2005) esses agentes anestésicos atuam deprimindo os sistemas respiratório e cardiovascular. Induzem a anestesia e subseqüente

² A via intraperitoneal é normalmente a mais utilizada na experimentação com roedores. A substância é injetada na cavidade peritoneal entre os órgãos abdominais. Em geral, injeta-se na metade posterior do abdômen, estando o animal contido pelo dorso. As agulhas destinadas a esse tipo de procedimento são as 25x5 ou 25x7mm. Vale salientar que a imobilização adequada é pré-requisito fundamental para o sucesso desse tipo de procedimento Paiva, Maffili e Santos (2005).

morte. São todos agentes aceitáveis quando utilizados com o equipamento apropriado, para evitar o desperdício e a contaminação do ambiente, a pesar de serem onerosos (Fig.4).



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 4. Eutanásia por anestesia inalatória de camundongos em prostração após isolamento viral *in vivo*.

A desinfecção e o descarte dos restos mortais dos animais mortos com sinais nervosos sugestivos de Raiva, bem como, daqueles eutanasiados se deu conforme indicação do manual de Procedimentos para Manipulação de Microorganismos Patogênicos e/ou Recombinantes (CTBio – FIOCRUZ, 2005 – p.45), segundo o qual animais infectados devem ser submetidos à autoclavação sendo, posteriormente, destinados ao recolhimento junto com o material de descarte do Laboratório de Virologia (LABOVIR/PPGCV/UECE).

Vale salientar que esse projeto de pesquisa foi encaminhado para apreciação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), sendo o início da sua execução condicionado ao parecer positivo por parte do mesmo (Processo nº 08185881-7).

3 Amostras Virais

A amostra viral utilizada no desenvolvimento do estudo foi a do vírus fixo Challenge Standard Virus (CVS-31) mantida por passagens em cérebros de camundongos e armazenada em estado liofilizado. Gentilmente cedida pela Dra. Phyllis Catharina Romijn da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO).

Segundo Coulon (1989), essa cepa viral pode ser considerada um bom modelo para a realização de estudos com vírus da Raiva em função da homogeneidade das curvas de mortalidade após inoculação intracerebral, com a ausência de sobreviventes quando as doses administradas são superiores a $10 \times DL_{50}$. Adicionalmente, a cepa CVS produz o curso sintomatológico característico da Raiva, resultante das propriedades típicas das cepas fixas em termos de período de incubação, efeitos patológicos e quadro clínico.

O vírus semente (amostra liofilizada) foi submetido ao protocolo de amplificação viral, mediante a realização de três passagens sucessivas *in vivo* pela inoculação intracerebral de camundongos albino suíços de aproximadamente três semanas de idade.

4 Teste Piloto

Dada à variedade de fatores capazes de afetar a qualidade da amostra, a realização preliminar de testes piloto caracteriza-se como um passo essencial no intento de se proporcionar melhores condições à coleta dos espécimes, evitando o comprometimento das amostras definitivas e propiciando a confecção de estudos com delineamento de melhor qualidade (HOLLAND et al., 2003).

Segundo Marconi e Lakatos (2006), o teste piloto consiste na avaliação dos instrumentos da pesquisa sobre uma pequena parte do “universo” ou da amostra, antes da aplicação definitiva dos protocolos experimentais, com o objetivo de averiguar até que ponto esses têm, realmente, condições de garantir resultados isentos de erros. Em geral, é suficiente a mensuração em 5% a 10% do tamanho da amostra, dependendo do número absoluto dos processos mensurados.

No presente trabalho, o teste piloto foi instituído entre os meses de janeiro e fevereiro de 2009. Um quantitativo de 15 camundongos albinos suíços, de três semanas de idade, foi requisitado nessa etapa, perfazendo uma taxa aproximada de 5% da amostra inicial de animais demandada pelo projeto. Nessa fase foi avaliada a execução dos procedimentos anestésicos, da técnica de inoculação intracerebral (IC), dos protocolos de coleta de amostras

do Sistema Nervoso Central (tecido cerebral), a preparação das suspensões virais a 20%, a 10% e das diluições decimais destinadas à titulação viral, bem como, do método de eutanásia.

Ademais, a efetivação do teste piloto propiciou a adequação dos protocolos de criopreservação, aquisição de experiência na preparação dos crioprotetores, avaliação dos recipientes destinados à alocação das amostras, identificação de problemas ou dificuldades metodológicas, adaptação às normas de biosegurança e treinamento da equipe executora.

5 Agentes Crioprotetores

Foram selecionados alguns dos agentes crioprotetores mais utilizados em protocolos de congelação de microrganismos (HOWELL et al., 1983; HUBÁLEK, 2003). Na literatura, as concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizadas variam entre 1 e 32% (mediana ~ 10%), o glicerol (GLY) é aplicado em concentrações de 2-55% (mediana 10%), o polietilenoglicol 6000 (PEG) tem sido usado nas concentrações de 5-45% (mediana 10%) e a sacarose (SUC), a concentrações de 1-68% (mediana 10%) (HUBÁLEK, 2003).

Elegeram-se as concentrações medianas e máximas dos agentes crioprotetores. As medianas foram escolhidas em função da presença dos valores extremos entre as concentrações, visto que nesses casos a média aritmética dos valores não refletiria a medida da tendência central (MARCONI e LAKATOS, 2006). Por outro lado, as concentrações máximas foram utilizadas para verificar se concentrações mais elevadas promoveriam declínio da viabilidade viral.

Os crioprotetores foram diluídos em tampão salina-fosfato (PBS pH 7,2 – Laborclin®) e todos foram esterilizados por filtração (filtro para seringa de membrana polietersulfônica com tamanho de poro de 0,22 µm de diâmetro – Millipore®).

6 Amostras de Tecido

Foi realizada, inicialmente, a inoculação de camundongos albinos suíços, de três a quatro semanas de idade, inoculados com 0,03mL da cepa viral CVS-31 em suspensão a 20% pela via intracerebral (IC). Todos os animais que manifestarem sinais característicos da Raiva foram submetidos à eutanásia, em estado agônico, a partir do 5º dia pós-inoculação (VALENTINI, 1991). Após a eutanásia, realizou-se a coleta do Sistema Nervoso Central (SNC) (KOPROWSKI, 1996), sendo os tecidos destinados à execução dos protocolos experimentais e testes de viabilidade viral (Fig.5).



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 5. Processo de composição das amostras destinadas a criopreservação pela inoculação intracerebral de camundongos.

Um total de 350 encéfalos provenientes de camundongos infectados pela cepa CVS-31 de vírus da Raiva foi utilizado. Cada uma das amostras de tecido nervoso pesava aproximadamente 0,2g. Esse material destinou-se à constituição de uma amostra composta (“pool”), na qual o material coletado foi combinado e homogeneizado, visando restringir a variabilidade característica das amostras individuais e possibilitando, assim, a execução de comparações entre os protocolos de criopreservação, sem comprometimento da validade das inferências elaboradas (Fig.6).

Obteve-se um volume final de cerca de 70g, distribuído uniformemente em 140 alíquotas de 0,5g cada, destinadas à composição das amostras de tecido cerebral infectado que, por sua vez, deram subsídio à execução dos oito protocolos experimentais (duas concentrações de cada um dos quatro crioprotetores) e à instituição dos controles positivos. Os controles negativos foram constituídos pelo “pool” de amostras provenientes de camundongos de três a quatro semanas de idade, inoculados com 0,03mL de solução salina

tamponada (PBS) pH 7,2 pela via intracerebral. Os animais eram observados por no mínimo 10 dias e submetidos à eutanásia, procedendo-se, em seguida, a coleta do SNC.



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 6. Processo de elaboração de amostras compostas (“pool”) destinadas à criopreservação.

7 Protocolos de Criopreservação

Os protocolos de criopreservação do vírus da Raiva à temperatura de -20°C dividiram-se em função das variáveis de tempo e do tipo de crioprotetor aplicado. Foram estabelecidos intervalos temporais regulares para a execução dos testes laboratoriais (isolamento viral, titulação viral e imunofluorescência direta), no sentido de avaliar a viabilidade das amostras virais mediante as distintas técnicas de conservação instituídas.

Nos procedimentos de criopreservação, foram utilizados dois crioprotetores penetrantes ou intracelulares (dimetilsulfóxido e glicerol) e dois crioprotetores não penetrantes ou extracelulares (sacarose e polietilenoglicol) nas concentrações, como descrito anteriormente. Ademais, foram elaborados dois grupos controle positivo, um não exposto a crioprotetores e o outro submetido à congelação com PBS pH 7,2 – o que possibilitou o acompanhamento das amostras segundo a hipótese da congelação do tecido cerebral a -20°C ser a forma usualmente empregada para a preservação do vírus da Raiva.

Para serem submetidas ao processo de congelação, as alíquotas eram equilibradas em 10% e 32% de DMSO, 10% e 55% de GLI, 10% e 45% de PEG, 10% e 68% de SAC e em PBS por 20 minutos a 20°C . Após o período de equilibração, as amostras eram transferidas para um freezer -20°C e mantidas de acordo com o cronograma de execução.

Ao serem requeridas, as amostras passaram pelo processo de descongelação, executando-se a exposição das alíquotas à temperatura ambiente por 1 minuto, em seguida sendo colocadas em banho-maria a 37°C até a completa descongelação e sendo, imediatamente, removidas após o processo. A utilização das alíquotas acontecia tão logo se procedesse ao degelo, com a manutenção das amostras a 4°C por um curto período de tempo até a manipulação (GOULD, 1995).

Contudo, vale destacar que, concluída a descongelação do material, é necessária a imediata remoção do crioprotetor. Assim, as alíquotas estocadas com agentes crioprotetores eram submetidas a duas lavagens consecutivas, com duração média de cinco minutos, sendo essas realizadas com PBS pH 7,2 à temperatura ambiente (RODRIGUES et al., 2005). As suspensões contendo as amostras virais eram diluídas em 2 mL de PBS, equilibradas por cinco minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 150-200G por cinco minutos, tendo seu sobrenadante eliminado. Repetia-se o mesmo processo por uma segunda vez e, finalmente, o pellet eram suspenso no diluente viral para execução dos testes de viabilidade.

Os controles positivos - submetidos à congelação em PBS pH 7,2 - também passaram pelos processos de lavagens sucessivas, funcionando como testemunhas dos efeitos desse protocolo sobre a viabilidade das amostras.

8 Suspensões Virais

A composição das suspensões virais foi realizada de acordo com a descrição de Koprowski (1996), segundo o qual o peso da amostra em gramas deve ser multiplicado por quatro para fornecer o volume do diluente requerido em mililitros na elaboração das suspensões a 20%. Um grama do tecido cerebral era depositado no gral e macerado, adicionando-se quatro mililitros (4mL) do diluente viral (para suspensões a 20%) e utilizando-se meio grama do tecido (0,5g) para quatro e meio mililitros (4,5mL) do diluente na elaboração de suspensões a 10%.

As amostras maceradas e diluídas eram transferidas para tubos tipo Falcon de 12mL com tampa de rosca externa para impedir a dispersão de aerossóis durante sua manipulação. Os tubos eram agitados para garantir uma homogeneização regular da mistura. Em seguida, procedia-se a centrifugação do material por cinco minutos a 150-200G no intuito de remover partículas grosseiras presentes nas suspensões (clarificação). O sobrenadante era transferido para eppendorfs, sendo o restante desprezando em hipoclorito de sódio a 20%.

O diluente empregado na elaboração das suspensões virais era constituído por PBS pH 7,2, esterilizado mediante filtração (filtro Millipore 0,22 µm), e adicionado de penicilina e estreptomicina (Sigma®) numa concentração final de 500UI de penicilina e 2mg (1560 UI) de estreptomicina por mililitro de tecido em suspensão. A adição de antibióticos foi um critério adotado em todas as suspensões, incluindo os controles negativos, como medida preventiva à ocorrência de mortes por uma possível contaminação bacteriana durante a manipulação dos espécimes, elaboração das suspensões ou condução das inoculações.

9 Isolamento Viral

Amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) eram pesadas, trituradas e maceradas em gral, com subsequente diluição a 20% como descrito anteriormente no protocolo da Organização Mundial de Saúde (KOPROWSKI, 1996). Eram destinados à prova biológica grupos de dez a doze camundongos albinos suíços desmamados (entre três e quatro semanas) por amostra a ser testada.

A suspensão teste era inoculada por via intracerebral num volume de 0,03mL (30µl), utilizando-se seringas de insulina BD Ultra-fine IITM, agulha curta, calibre 31, 8mm (5/16”) para 30 unidades ou menos (Fig.5). Esse modelo de seringa foi escolhido durante o teste piloto por possibilitar um maior refinamento da técnica de inoculação, mediante redução do trauma mecânico e, conseqüentemente, do declínio das taxas de mortalidade, bem como, propiciar uma recuperação mais rápida dos animais e oferecer maior conforto ergonômico ao profissional quando comparada aos demais modelos.

Efetuados os procedimentos de inoculação, procedeu-se o acompanhamento dos animais por até 21 dias, visto que é infreqüente a detecção do vírus da Raiva em camundongos após esse período. Apesar do vírus da Raiva raramente causar sinais clínicos em camundongos antes do quinto dia pós-inoculação, os animais eram checados desde o primeiro dia. O número de animais encontrados normais, doentes ou mortos era registrado sistematicamente em fichas de acompanhamento vinculadas a cada uma das caixas, na qual constava, também, a identificação completa dos animais e detalhamento dos protocolos experimentais aos quais os mesmos foram submetidos (KOPROWSKI, 1996; XAVIER, 2005). Os controles negativos foram inoculados com PBS pH 7,2 acrescido de antibióticos (diluente viral).

Ademais, os sinais clínicos eram identificados e relatados nas fichas utilizando um sistema de códigos numéricos: 1 – redução do consumo de água e ração; 2 – apatia e pelos

arrepiados; 3 – descoordenação; 4 – tremores e/ou episódios de tetania; 5 – paralisia e 6 – prostração (estado agônico que precede a morte dos animais) (adaptado de KOPROWSKI, 1996) (Fig.7).



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 7. Evolução dos sinais clínicos da infecção pelo vírus da Raiva (cepa CVS-31) em camundongos.

Os camundongos inoculados eram mantidos em gaiolas apropriadas, no infectório do Laboratório de Virologia (LABOVIR) da Universidade Estadual do Ceará durante todo o período de observação, a uma temperatura média de 22°C, com ciclo de 12 horas de claro e escuro, sendo oferecido água e ração em sistema *ad libitum*.

O processo de isolamento viral foi efetuado em todas as amostras de tecido cerebral submetidas aos protocolos de criopreservação (dimetilsulfóxido, glicerol, sacarose, polietilenoglicol) fazendo-se uso dos controles positivo e negativo e levando-se em conta os intervalos cronológicos pré-determinados.

10 Titulação Viral

A titulação viral foi realizada com base na execução de diluições decimais seriadas, ou seja, em progressão geométrica de razão 10 com o diluente viral, tomando-se como partida uma suspensão inicial de cérebro de camundongos a 10% (p/v) (KOPROWSKI, 1996). Cada uma das diluições virais foi inoculada por via intracerebral (IC) em grupos de seis camundongos desmamados (três semanas de idade), num volume de 0,03mL e em diluições que variem entre 10^{-1} e 10^{-6} . O processo de titulação viral foi efetuado nas amostras de tecido cerebral instituídas como controle positivo aos protocolos de criopreservação.

Os camundongos inoculados foram observados diariamente por 21 dias, no sentido de se detectar manifestações da doença e se avaliar a taxa de mortalidade. Os animais mortos a partir do quinto dia pós-inoculação, com manifestações de sinais neurológicos patognomônicos da doença, foram considerados positivos. Ao final do período de observação, os títulos virais tiveram seus cálculos embasados no método descrito por Reed e Muench (1938), associado à técnica desenvolvida por Kuehne (1983), sendo expressos em Log_{10} da $\text{DL}_{50}/0,03\text{mL}/\text{IC}$ (dose letal 50% por 0,03mL via IC em camundongos).

Segundo Kuehne (1983), a tabela apresentada a seguir (Tabela 1) pode ser utilizada como recurso capaz de minimizar a incidência de erros, evitando o desperdício de tempo com cálculos manuais complexos e permitindo a obtenção dos valores da DL_{50} com referência nos resultados da titulação. Os valores determinados são compatíveis com protocolos de titulação que fazem uso de seis animais por diluição, quantitativo comumente empregado em titulações virais e de anticorpos no soro.

Tabela 1. Valores Log₁₀ DL₅₀ com seis animais por diluição.

No. afetado à diluição indicada						No. afetado à diluição indicada					
10 ^{-A}	10 ^{-B}	10 ^{-C}	10 ^{-D}	10 ^{-E}	DL ₅₀	10 ^{-A}	10 ^{-B}	10 ^{-C}	10 ^{-D}	10 ^{-E}	DL ₅₀
6	5	5	5	0	D.20	6	4	3	1	0	B.84
6	5	5	4	0	D.00	6	4	3	0	0	B.69
6	5	5	3	0	C.71	6	4	2	2	0	B.75
6	5	5	2	0	C.53	6	4	2	1	0	B.63
6	5	5	1	0	C.40	6	4	2	0	0	B.50
6	5	5	0	0	C.30	6	4	1	1	0	B.47
6	5	4	4	0	C.80	6	4	1	0	0	B.36
6	5	4	3	0	C.55	6	4	0	0	0	B.25
6	5	4	2	0	C.38	6	3	3	3	0	C.00
6	5	4	1	0	C.24	6	3	3	2	0	B.83
6	5	4	0	0	C.13	6	3	3	1	0	B.67
6	5	3	3	0	C.33	6	3	3	0	0	B.50
6	5	3	2	0	C.16	6	3	2	2	0	B.59
6	5	3	1	0	C.00	6	3	2	1	0	B.45
6	5	3	0	0	B.84	6	3	2	0	0	B.31
6	5	2	2	0	B.88	6	3	1	1	0	B.29
6	5	2	1	0	B.76	6	3	1	0	0	B.16
6	5	2	0	0	B.64	6	3	0	0	0	B.00
6	5	1	1	0	B.60	6	2	2	2	0	B.37
6	5	1	0	0	B.50	6	2	2	1	0	B.20
6	5	0	0	0	B.40	6	2	2	0	0	B.00
6	4	4	4	0	C.63	6	2	1	1	0	B.00
6	4	4	3	0	C.41	6	2	1	0	0	A.88
6	4	4	2	0	C.25	6	2	0	0	0	A.75
6	4	4	1	0	C.12	6	1	1	1	0	A.80
6	4	4	0	0	C.00	6	1	1	0	0	A.70
6	4	3	3	0	C.17	6	1	0	0	0	A.60
6	4	3	2	0	C.00	6	0	0	0	0	A.50

Para o uso da tabela, considera-se a letra A como log₁₀ da diluição mais alta capaz de desencadear o efeito esperado (mortalidade, infectividade, imunidade, sobrevivência etc.) em todos os seis animais testados e as letras B até E os valores de log₁₀ das quatro diluições decimais consecutivas.

Tabela 2. Exemplos dos resultados de uma titulação típica com diluições na razão 10.

Exemplo	No. afetado à diluição indicada/No. testado								Valor de A	Valor DL ₅₀ (Tabela 1)	Log ₁₀ DL ₅₀
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸			
1	6/6	6/6 ^A	5/6 ^B	4/6 ^C	2/6 ^D	0/6 ^E	0/6		2	C.38	4.38
2		6/6	6/6 ^A	4/6 ^B	2/6 ^C	2/6 ^D	0/6 ^E		3	B.75	4.75
3		6/6	6/6	6/6	4/6 ^B	3/6 ^C	1/6 ^D	0/6 ^E	4	B.84	5.84

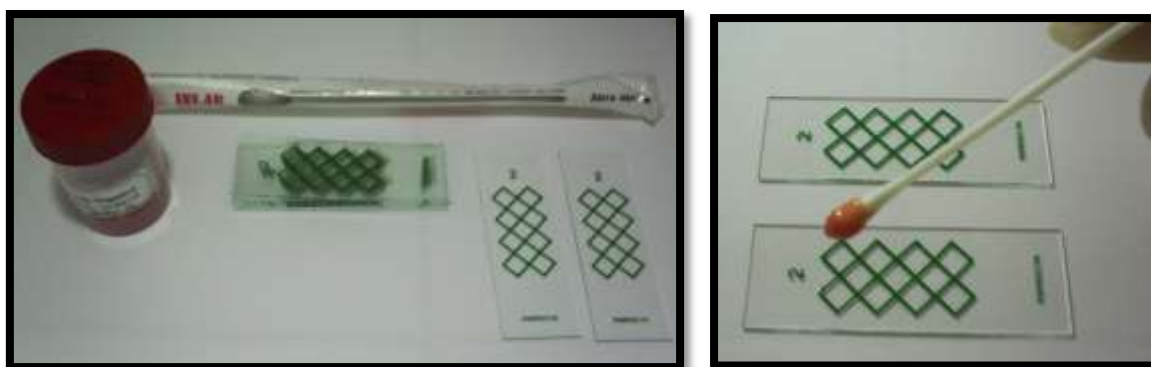
Um exemplo típico de titulação é dado na Tabela 2. No exemplo 2, A = 3, B = 4, C = 5 etc. Recorrendo aos valores expressos na Tabela 1, é possível identificar a DL₅₀

associada à linha 6,4,2,2,0 representada como B.75. Com $B = 4$ nesse exemplo, o $\log_{10} DL_{50}$ será 4,75. A tabela comprova não ser necessário mais do que cinco diluições para se alcançar entre 100 e 0% de resposta, existindo uma relação dose-resposta ordenada.

11 Imunofluorescência Direta

Os procedimentos empregados no preparo e leitura das lâminas submetidas ao teste de Imunofluorescência Direta (IFD) seguiram, basicamente, as diretrizes preconizadas por Dean, Abelseth e Atanasiu (1996) com as alterações no período de incubação do conjugado propostas por Roehe, Schaefer e Pereira (2002). O intuito é o de se obter uma fluorescência de intensidade sensivelmente maior, segundo os autores, em relação à metodologia padrão recomendada.

As impressões das amostras de tecido encefálico provenientes de camundongos infectados foram dispostas por pressão em lâminas apropriadas para imunofluorescência (fig.8), dispondo-se do auxílio de ‘swabs’ devido a submissão dos espécimes ao processo de formação do “pool”. Após a confecção da impressão do antígeno, as lâminas eram fixadas em acetona gelada (-20°C) por 30 minutos. A secagem era feita à temperatura ambiente, procedendo-se a estocagem em freezer, com vistas à posterior efetivação da leitura.



(Fonte: LABOVIR/UECE, 2010)

Figura 8. Confecção da lâmina para imunofluorescência.

Para a execução da técnica de imunofluorescência direta, as lâminas eram colocadas à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo cobertas com 100µl de conjugado anti-rábico marcado com isotiocianato de fluoresceína (BioRad®) e submetidas a um período de incubação de 1 hora, a 37°C em câmara úmida. Em seguida, as mesmas eram lavadas duas

vezes com solução salina tamponada (PBS pH 7,2) por cinco minutos, procedendo-se um enxágüe final com água destilada.

Executou-se leitura da reação no microscópio binocular de imunofluorescência da marca Carl Zeiss, equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio HBO 50, filtro excitador VGI e filtro barreira Zeiss 43, no aumento de 400X em campo escuro. A intensidade de fluorescência observada na impressão foi submetida à avaliação, tomando-se por base uma escala subjetiva de intensidade, variando de zero a quatro como descrito por Bingham e Merwe (2002) e adaptado aos seguintes componentes simbólicos: (-), ausência de antígenos em toda a impressão; (+), antígenos muito escassos, uma ou mais partículas em menos de 50% dos campos microscópicos; (++) , antígenos escassos, uma ou mais partículas em menos de 100% dos campos, porém em mais de 50% dos campos microscópicos; (+++), antígenos abundantes, uma ou mais partículas em cada campo, mas a quantidade por campo microscópico é “possível de ser contada”; (++++), antígenos muito abundantes em todos os campos e a quantidade por campo “impossível de ser contada”.

Cada impressão foi examinada e classificada de modo independente por dois observadores sob sistema duplo-cego, considerando-se a modalidade de controle de “bias” de mensuração, com o incremento da confiabilidade na classificação das lâminas pelo controle da subjetividade avaliativa atribuída ao teste (ROUQUAROL e FILHO, 2003). Na ocorrência de desacordo frente aos critérios de classificação, os respectivos casos eram reexaminados no intuito de se estabelecer um consenso entre os examinadores.

Adicionalmente, foi considerado o grau de dificuldade do diagnóstico por imunofluorescência direta descrito por Bingham e Merwe (2002), segundo o qual lâminas com escores (+++) e (++++) são consideradas de “fácil” diagnóstico, enquanto escores (+) e (++) são descritos como de “difícil” diagnóstico.

12 Medidas de Biosegurança

O estabelecimento de um Programa de Biosegurança visa disciplinar o desenvolvimento de trabalhos que envolvam a manipulação de microrganismos patogênicos de acordo com sua classificação de risco, visando prevenir a incidência de acidentes. De acordo com a Instrução Normativa nº 7 da CTNBio – D.O.U. de 10 de junho de 1997, vírus da Raiva, incluindo todas as suas cepas, estão classificados como patógenos com classe de risco 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A classe de risco 2 é definida pelo moderado risco individual e limitado risco à comunidade. Essa categoria inclui os agentes capazes de causar doença no homem ou nos animais, mas que, contudo, não apresentam riscos sérios para os profissionais de laboratório, à comunidade, aos animais e/ou ao meio ambiente, sendo requerido o Nível de Biosegurança 2 (NB-2) para o trabalho com esses microorganismos (CTBio – FIOCRUZ, 2005).

Com base nos critérios anteriormente descritos, fez-se necessária a ênfase de algumas condutas direcionadas à manipulação de agentes com Classe de Risco 2 e Nível de Biosegurança 2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006):

- nunca pipetar com a boca qualquer substância, devendo-se fazer uso de dispositivos mecânicos;
- não comer, beber ou fumar na área de trabalho do laboratório;
- não armazenar alimentos nem bebidas nas áreas de trabalho;
- não aplicar maquiagem ou usar adereços;
- usar o equipamento de proteção individual como aventais ou jalecos, protetor facial, máscaras, óculos de proteção, luvas, sapatilhas descartáveis etc;
- limitar ou restringir o acesso ao laboratório;
- proibir a entrada de crianças na área de trabalho do laboratório;
- impedir o acesso de animais que não tenham relação com os trabalhos;
- realizar todos os procedimentos cuidadosamente, a fim de minimizar a criação de borrifos ou aerossóis;
- descontaminar as superfícies de trabalho com agentes desinfetantes adequados ao final dos procedimentos e após qualquer vazamento ou borrimo de material viável;
- lavar as mãos após a manipulação de materiais viáveis, depois da remoção das luvas e antes de sair do laboratório;
- colocar, na entrada do laboratório, o símbolo de Risco Biológico;
- descontaminar os resíduos produzidos, antes de serem descartados. Os materiais passivos de descontaminação, fora do próprio laboratório, deverão ser colocados em recipientes à prova de vazamentos e hermeticamente fechados para serem transportados;
- utilizar cabines de segurança biológica, mantidas de forma adequada, sempre que sejam realizados procedimentos com elevado potencial de criação de aerossóis e quando altas concentrações ou grandes volumes do agente infeccioso sejam manipulados;
- descartar os materiais perfuro-cortantes, tais como agulhas, lamínulas, tubos de vidro e outros materiais de uso corrente, em recipientes de paredes rígidas, devidamente identificados;

- assegurar-se que as saídas de emergência se encontrem livres de obstáculos;
- manter extintores para diferentes tipos de fogo, com seu correspondente controle periódico, assim com ter o número de telefone dos bombeiros em lugar visível;
- manter a obrigatoriedade da vacinação anti-rábica preventiva para todo o pessoal de laboratório e controlar, periodicamente, o título de anticorpos neutralizantes.

Adicionalmente, o uso de animais de laboratório remete a procedimentos padrões de biosegurança (CTBio – FIOCRUZ, 2005):

- os procedimentos, equipamentos de proteção e as instalações deverão ser cuidadosamente escolhidos, sempre de acordo com o agente patogênico, a espécie animal envolvida e o tipo de ensaio a ser desenvolvido, demandando medidas de contenção compatíveis;
- seguir as diretrizes, padrões, regulamentos e leis relativas aos cuidados e manutenção dos animais em experimentação;
- assegurar que todos os profissionais que tenham contato com estes animais e/ou com os descartes oriundos de atividades a eles relacionadas, estejam familiarizados com os procedimentos, os cuidados necessários e riscos envolvidos. Providenciar, quando necessário, imunizações e a avaliação sorológica destes profissionais;
- os animais devem ser mantidos em gaiolas que evitem fuga, nos casos de roedores deve se dar especial atenção as tampas das gaiolas;
- todas as gaiolas devem possuir ficha de identificação que contenha as seguintes informações: número de animais, linhagem, sexo, idade, peso, data da infecção, identificação do microorganismo inoculado, cepa, via e dose de inoculação, bem como o nome do pesquisador responsável e telefone;
- relatar e notificar todo e qualquer acidente, provenientes do manuseio dos animais ou gaiolas;
- quaisquer animais encontrados fora das gaiolas e que não possam ser identificados devem ser sacrificados e suas carcaças autoclavadas. Na eventualidade do animal escapar das imediações do laboratório, as autoridades competentes deverão ser prontamente notificadas;
- após o término do ensaio com os animais, todos os materiais que tiveram contato com os animais infectados deverão ser descontaminados preferencialmente por autoclavação, porém pode-se utilizar outros procedimentos de descontaminação adequados aos microorganismo em questão.

APÊNDICE II

(Questionário Semi-Estruturado)

	Universidade Estadual do Ceará Faculdade de Veterinária Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias Av. Paranjana, 1700 – CEP: 60.740-000 – Fortaleza – CE Fone: (085) 3101.9860 – Fax: (085) 3101.9840 – E-mail: pgvet@uecc.br	Cód. _____ 
Identificação da Instituição		
Nome da Instituição: _____ Tipo de Instituição: ☐ pública ☐ privada ☐ filantrópica ☐ outra. Especificar: _____ Há quanto tempo a Instituição trabalha com vírus da Raiva? _____ Atividades executadas: ☐ diagnóstico ☐ controle e prevenção ☐ pesquisa ☐ produção de vacinas ☐ outras. Especificar: _____ Espécies animais com as quais trabalha: Obovina Ocáprina Oovina Oeqüina Ocanina Ofelina Outra. Especificar: _____ Oanimais silvestres. Especificar: _____ A instituição realiza estocagem/conservação de amostras de vírus da Raiva? ☐ sim ☐ não (Caso a resposta seja ☒ sim, prosseguir para o próximo bloco de perguntas).		
Estocagem/Conservação de Amostras		
1 Tipos de amostras estocadas: ☐ Tecido Nervoso - Especificar: _____ ☐ Suspensão Viral ☐ Soro ☐ Órgão (s) - Especificar: _____ ☐ Outros - Especificar: _____ 2 Técnica(s) empregadas no processo de estocagem: ☐ Resfriamento (4°C) ☐ Congelação (-20°C) ☐ Congelação (-80°C) ☐ Nitrogênio ☐ Glicerol ☐ Outros. Especificar: _____ 3 Equipamentos utilizados para a estocagem / conservação das amostras: (especificar ao lado de cada item: a quantidade de equipamentos e a marca). ☐ Refrigerador (n = _____) Marcas: _____ ☐ Freezer vertical (n = _____) Marcas: _____ ☐ Freezer horizontal (n = _____) Marcas: _____ ☐ Freezer (-80°C) (n = _____) Marcas: _____ ☐ Outros. Especificar: _____	4 Tipo de recipiente utilizado para o acondicionamento das amostras: ☐ Coletor universal ☐ Ependorff: () não estéril () estéril () livre de RNase ☐ Criotubo ☐ Outros - Especificar: _____ 5 Tempo médio de estocagem das amostras: _____ 6 Objetivos da estocagem/conservação: _____ _____ _____ 7 Nível de Biossegurança do laboratório: ☐ NB-1 (Nível de Biossegurança 1) ☐ NB-2 (Nível de Biossegurança 2) ☐ NB-3 (Nível de Biossegurança 3) ☐ NB-4 (Nível de Biossegurança 4) 8 Observações: (No caso de haver informações extra sobre o assunto). _____ _____ _____ _____ _____	

APÊNDICE III

(Termo de Consentimento)



Universidade Estadual do Ceará - UECE
Faculdade de Veterinária - FAVET
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - PPGCV
Av. Paranjana, 1700 – CEP: 60.740-000 – Fortaleza – CE
Fone: (085) 3101.9860 – Fax: (085) 3101.9840 – E-mail: pgvet@uece.br



TERMO DE CONSENTIMENTO

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação dos protocolos de criopreservação de amostras do vírus da Raiva dos principais serviços de diagnóstico e pesquisa.

Pesquisadores responsáveis: Ms. Benedito Neilson Rolim e Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira (orientadora)

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): Celular: (085) 8836.1060

Laboratório de Virologia (LABOVIR/FAVET/UECE) - Fone/Fax: (085) 3101.9849

E-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br

Pesquisadores participantes: Ms. Edmara Chaves Costa e Dra. Valeska Shelda Pessoa de Melo

Telefones para contato: (085) 3101.9860 (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV) e

Fax: (085) 3101.9840.

- **Objetivo da Pesquisa:** Averiguar os métodos de conservação das amostras do vírus da Raiva empregados nos principais serviços de diagnóstico e pesquisa da Raiva a nível nacional.
- **Coleta dos dados:** O instrumento de investigação consiste no questionário semi-estruturado composto por perguntas sobre os protocolos e rotinas empregadas na conservação de amostras virais.
- O presente estudo não implica riscos ou prejuízos aos participantes.
- Os benefícios advindos da pesquisa abrangem a contribuição para o estabelecimento de protocolos universais de criopreservação das amostras o vírus da Raiva em âmbito nacional.
- Aos participantes será garantido o anonimato e o sigilo sobre as informações prestadas, tendo os mesmos o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Avaliação dos protocolos de criopreservação de amostras do vírus da Raiva dos principais serviços de diagnóstico e pesquisa**. Fui devidamente informado e esclarecido pelo sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a alguma penalidade.

Local e data _____

Nome e Assinatura do participante: _____