

### 13. Isolamento viral em cultivo celular

1. Preparar uma placa de 6 poços com um tapete pré-formado (18-24 horas). Nunca inocular células preparadas no mesmo dia. Use células de acordo com a espécie animal de origem e vírus suspeito, segundo a tabela apresentada a seguir.

**Principais vírus isolados na rotina e células susceptíveis para replicação *in vitro*:**

Vírus	Tipos Celulares
Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)	MDBK, SK-6, PK15, BT, cultivos primários de pulmão, corneto nasal, rim e testículo de bovino
Herpesvírus Bovinos tipos 1 e 5 (BoHV-1 e 5)	MDBK, CRIB, HeLa, BT, EBTr e cultivos primários de pulmão, corneto nasal, rim e testículo bovino.
Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV)	MDBK, BT e cultivos primários de células do trato respiratório de bovinos.
Vírus da Mamilite Herpética (BoHV-2)	MDBK, CRIB e cultivos primários de origem bovina
Herpesvírus Canino (CaHV)	MDCK e cultivos primários de rim canino.
Ectima Contagioso (ORFV)	HeLa, VERO, cultivos primários de rim e testículo ovino e bovino; fibroblastos de galinhas e patos.
Herpesvírus Equino	VERO, ED, RK-13, MDBK, BHK-21 e cultivos primários de rim equino e fibroblastos da derme equina.
Calicivírus Felino (FCV)	CRFK, FCWF-4, Fe3TG, VERO e fibroblasto felino

Fonte: FLORES, 2007.

2. Preparo do material:

- i. **Sangue**: Adicionar o tampão de hemólise e centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm, coletar a capa flogística e inocular 400µL ou que conseguir coletar. Ver o protocolo completo em “Separação da Capa Flogística”.

- ii. **Tecidos:** macerar 1g de tecido com areia estéril, adicionar 9mL de MEM 2X antibiótico, centrifugar à 3500 rpm por 10 minutos à 4°C. Inocular 400µL por poço. No caso de se fazer um *pool* de tecidos pode-se utilizar 2 gramas de tecido.
  - iii. **Swabs:** centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm a 4°C, coletar o sobrenadante e inocular 400µL.
  - iv. **Sêmen:** realizar diluição (1:10) em soro fetal bovino antes de inocular para diminuir a toxicidade do material.
3. Adsorver durante 2 horas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C, agitar levemente a placa a cada 15 minutos,
  4. Lavar bem (3x) com MEM 2x antibiótico, repor MEM + 2 a 5% de soro.
  5. Monitorar o aparecimento de ECP durante 3 dias. Ao final do terceiro dia congelar, descongelar, centrífugar e inocular o sobrenadante em um novo tapete de células. Repetir o processo 3 vezes. Ao final da terceira passagem realizar IFA.
  6. Em caso de isolamento positivo, deve-se aliquotar o sobrenadante e identificar (vírus, isolado/SV e data).

**OBS.:**

- A realização do isolamento em material experimental pode ser feita em placas de 24 cavidades;
- Nunca utilizar placas com células preparadas no mesmo dia, ou seja, preparar as células pela manhã e inocular à tarde;
- A realização da IFA deve ser realizada para a confirmação do vírus isolado (caso tenha ocorrido ECP no tapete de células) ou para a identificação de vírus não-citopáticos.
- Guardar uma alíquota do tecido ou do material original sempre que possível, com nome, SV e data.

## **14. Amplificação viral (estoque)**

1. Para obter um estoque viral que possa ser utilizado nas técnicas de soroneutralização, titulação, liofilização, estoque, inoculação em animais, etc, é primordial que se tenha um título alto.
2. A amostra viral a ser amplificada deve ser livre de contaminantes (vírus, bactérias e fungos), podendo ser de um isolado de campo, liofilizado, recebido de outro laboratório etc...
3. Prepare uma garrafa com células susceptível ao vírus, obrigatoriamente a garrafa deve ser preparada no dia anterior a inoculação. A monocamada deve estar com confluência de 60-70%. Nunca inocule células não confluentes ou com confluência perto de 100%. Lembre-se a multiplicação está diretamente ligada à qualidade do cultivo, qualquer alteração no cultivo irá refletir no título final do vírus.
4. Prepare a solução de vírus para ser inoculada, utilize o menor volume possível como inóculo (varia de 250µL a 3mL). Remova o meio de cultivo e adicione inóculo, incube a 37°C durante 1 ou 2 horas, a cada 15 minutos agite a garrafa para espalhar o inóculo.
5. Após uma hora, remova o inóculo e adicione o meio de cultivo contendo entre 2-5% de soro. O volume de meio repostado deve ser inferior ao volume de cultivo, isso irá facilitar a concentração de vírus e aumentar o título.
6. Observe diariamente o cultivo e quanto o efeito citopático estiver próximo de 100% congelar o frasco a -80°C.
7. Descongelar as células e aliquotar em tubos de acordo com a finalidade. Opcionalmente, pode-se clarificar o sobrenadante, para isso deve ser centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C.
8. Rotule os tubos, frasco individualmente com NOME DO VÍRUS, DATA, PASSAGEM E IDENTIFICAÇÃO.