



NORMA TÉCNICA

L5.504

Abr/1991
28 PÁGINAS

Identificação de enterovirus: método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

[http: // www . cetesb . sp . gov . br](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROVÍRUS Método de ensaio	L5.504 ABR/91
--------	---	----------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	2
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	10
6 Resultados.....	17
Anexo A - Informações complementares.....	23
Anexo B - Procedimentos complementares.....	25
Anexo C - Referências bibliográficas.....	27

INTRODUÇÃO

O gênero Enterovírus pertence à família Picornaviridae que engloba vírus de 20 a 30 nm de diâmetro cujo genoma é constituído de RNA em fita simples. São vírus de forma icosaédrica, sem envelope, resistentes ao éter e ao pH 3,0. Estes vírus podem ser armazenados a -70°C por períodos longos, sem perder suas características de infectividade. O nome genérico "Enterovírus" se deve ao fato dos vírus deste grupo se replicarem no intestino delgado do homem ou animais e de serem excretados com as fezes. Ao grupo dos Enterovírus pertencem: os vírus Polio (tipos 1, 2, 3), Coxsackie A (tipos 1 a 24), Coxsackie B (tipos 1 a 6) e ECHO (tipos 1 a 32). Os Enterovírus não são flora normal no trato intestinal e assim são excretados só por indivíduos ou animais infectados. Os níveis de infecção variam consideravelmente de área para área, dependendo das condições sanitárias e sócio-econômicas. A maioria dos Enterovírus só são patogênicos para primatas (homem e macaco). Multiplicam-se "in vitro" em culturas celulares específicas, dando origem a um efeito citopático nítido.

Para que um vírus possa ser reconhecido é necessário que ele seja isolado (em culturas celulares ou em animais susceptíveis) para ser posteriormente identificado.

Várias linhagens de células de origem humana e animal são usadas para o isolamento de vírus e, entre estas, as que apresentam maior susceptibilidade aos Enterovírus são:

- BS-C-1: linhagem originada de células de rim de macaco africano verde (Cercopithecus aethiops).
- RD: linhagem originada de um rhabdomiosarcoma humano.
- BGM: linhagem originada de rim de macaco africano verde (Cercopithecus aethiops).
- LLC-MK₂: linhagem originada de rim de macaco Rhesus (Macaca mulatta).
- HE_P₂-S: linhagem originada de carcinoma epidermoide de laringe humana.
- Hela: linhagem originada de carcinoma cervical humano.

A identificação do vírus pode basear-se nas alterações citopatogênicas causadas pela sua replicação e reação de neutralização por anti-soros conhecidos. Esta reação é tipo-específica. Mais de 100 vírus entéricos humanos são conhecidos, uma vez que cada grupo ou subgrupo abrange diferentes tipos sorológicos.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os métodos que permitem identificar Enterovírus pela reação de soroneutralização (em microtécnica) através da qual os vírus já isolados são colocados frente a "pools" de anti-soros específicos.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- M1.002 - Lavagem, preparo e esterilização do material para cultura celular
- L5.501 - Preparo de culturas celulares para ensaios virológicos
- L5.502 - Enterovírus em água - Isolamento e quantificação.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.11.

3.1 DICT₅₀

Dose infectante 50% em cultura de tecidos.

3.2 Efeito citopatogênico (E.C.P.)

Efeito apresentado pelas células ao serem infectadas por partículas virais.

3.3 Meio de crescimento

Meio de cultura Eagle (Norma CETESB L5.502) contendo 10% de soro fetal bovino inativado com ou sem solução de penicilina-gentamicina. É usado para promover a multiplicação ativa das culturas celulares.

3.4 Meio de manutenção

Meio de cultura Eagle que contém de 1 a 2% de soro fetal bovino inativado com ou sem solução de penicilina-gentamicina. É usado para manter a cultura em estado metabólico baixo, não necessariamente em multiplicação.

3.5 Inativação do soro

Processo pelo qual, por aquecimento em banho-maria a 56°C durante 30 minutos, são inativados inibidores, e/ou aglutininas inespecíficas contidas no soro. É usado para o preparo dos meios de crescimento e manutenção.

3.6 "Pools" Lim e Benyesh-Melnick (A-H) para identificação de Enterovírus

Consistem em 42 anti-soros preparados mediante esquema de imunização em eqüinos, inoculando-se amostras de Enterovírus conhecidas. Estão combinadas em 8 "pools" (A-H) cada um contendo 10 a 11 anti-soros. Cada um dos "pools" é constituído de tal modo que um determinado anti-soro aparece em um, dois ou três "pools". Assim um determinado Enterovírus pode ser identificado através de sua neutralização, pelo "pool" ou "pools" que contêm seu anti-soro homotípico (Ver Anexo A).

3.7 "Pools" Lim e Benyesh-Melnick (J-P) para identificação de Enterovírus

Consistem em 19 anti-soros preparados mediante esquema de imunização em eqüinos, inoculando-se amostras conhecidas de vírus Coxsackie tipo A. Estão combinadas em 7 "pools" (J-P), cada um contendo 4 a 6 anti-soros (Ver Anexo A).

3.8 Titulação

Processo de quantificação das partículas virais infectantes presentes em uma suspensão. Determina a diluição que, inoculada em culturas celulares, produz E.C.P. em determinada preparação das mesmas (50%).

3.9 Título

Representa a quantidade de partículas virais (vírions) presentes em determinado volume de uma amostra. É expresso em $DICT_{50}$ (item 3.1).

3.10 Reação de soroneutralização

Neutralização do efeito citopatogênico de determinada suspensão viral sobre uma cultura celular através da incubação prévia do vírus com um anti-soro específico.

3.11 Soros monoespecíficos

Anticorpos que no complexo antígeno-anticorpo identificam um único antígeno.

4 APARELHAGEM

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Agitador tipo "Vortex"

4.1.2 Autoclave

Deve ter tamanho suficiente para permitir a circulação do vapor ao redor do material a ser esterilizado e ser equipada com válvula de segurança, manômetro e termômetro, cujo bulbo ficará na direção da linha de escape do vapor condensado (dreno). A autoclave deve ser normalmente operada a uma pressão de vapor de 103 kPa e produzir, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Deve-se observar, em seu funcionamento, a substituição por vapor de todo o ar existente na câmara. A operação total de uma autoclave deve durar no máximo uma hora, sendo recomendado o acompanhamento dos ciclos de operação e os registros de tempo-temperatura. É recomendável que a autoclave atinja a temperatura de esterilização de 121°C em 30 minutos e mantenha essa temperatura durante o período de esterilização.

4.1.3 Balança

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.4 Banho-maria

Equipado com termostato para temperatura de 45 a 60°C, com capacidade suficiente para comportar frascos de diversos tamanhos, cuja temperatura deve ser estabilizada antes da sua utilização.

4.1.5 Bomba de vácuo e pressão

4.1.6 Capela de segurança biológica (câmara de fluxo laminar vertical).

Equipamento que possibilite a retenção de partículas do ar através da passagem do mesmo por filtros HEPA, cuja eficiência é de 99,99% para partículas iguais ou maiores a 0,3 µm. O ar estéril produzido é dirigido em forma de fluxo direto sobre a área de trabalho, propor

cionando grande segurança nos manuseios que devem ser realizados em condições de máxima esterilidade como também proteção dos operadores.

4.1.7 Congelador

Certificado para manter a temperatura nas faixas de -20°C e -70°C respectivamente. O congelador a -20°C é destinado ao armazenamento de meios de cultura, soro fecal bovino e soros monoespecíficos, enquanto que o congelador a -70°C é utilizado para armazenamento e conseqüente preservação de vírus. A limpeza e desinfecção devem ser feitas periodicamente.

4.1.8 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, livre de substâncias que impeçam ou interfiram no desenvolvimento das culturas de células.

4.1.9 Estufa para esterilização e secagem

A estufa deve acondicionar pipetas, frascos para reagentes e meios de cultura e toda a vidraria e aparelhagem que puder ser esterilizada por calor seco, e ter capacidade para permitir a circulação do ar quente ao redor do material a ser esterilizado. Deve ser equipada com um termostato e operar normalmente a uma temperatura de 170 a 180°C . O tempo de esterilização para a maior parte da vidraria é de 4 a 6 horas, à temperatura de 170 a 180°C .

4.1.10 Gaze estéril

4.1.11 Incubadora bacteriológica

Deve ser equipada com termostato e projetada de tal forma que a temperatura em todas as partes utilizadas seja de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com capacidade para permitir a circulação do ar ao redor de todas as culturas, quando o material estiver sendo incubado. Para verificar a temperatura de uma incubadora grande, devem ser colocados um ou mais termômetros, com o bulbo submerso em água, glicerina ou óleo mineral, em lugares representativos da câmara e feitos registros periódicos da temperatura. A incubadora deverá manter 75 a 85% de umidade relativa e ser colocada em local onde a temperatura permaneça preferencialmente na faixa de 16 a 27°C .

4.1.12 Incubadora bacteriológica - CO_2

Deve ter as mesmas características especificadas no item 4.1.11 acrescida de uma demanda constante de atmosfera de CO_2 .

4.1.13 Materiais para preparação de meios de cultura

Recipientes de vidro neutro ou aço inoxidável. O material de aquecimento e os bastões devem estar limpos e isentos de qualquer substância

tância tóxica (nunca devem ser de cobre).

4.1.14 Membranas filtrantes

De éster de celulose, com porosidade de 0,22 μm e 0,45 μm , com 142 mm de diâmetro.

4.1.15 Micropipetadores

Pipetadores digitais com capacidade para medir volumes de 25, 50, 100, 200, 500 μL , com ponteiras de polipropileno apropriadas e autoclaváveis.

4.1.16 Microplacas não autoclaváveis

De plástico rígido não tóxico, com tampa, de 12,8 cm x 8,6 cm x 1,5 cm, com 96 orifícios de fundo em U.

4.1.17 Microscópio binocular de focalização invertida

4.1.18 Pinça dente de rato

4.1.19 Pipetas

Pipetas tipo Mohr de 1 mL, 5 mL e 10 mL com graduação de décimos da capacidade e erro de calibração inferior a 2,5% e com bocal para tampão de algodão. São guardadas em caixas de aço inoxidável. São esterilizadas por calor seco a uma temperatura de 170°C a 180°C, durante quatro horas.

4.1.20 Pisseta para álcool etílico a 70%

4.1.21 Pipetador automático

Ou outro dispositivo de segurança para sucção de conteúdos líquidos.

4.1.22 Pincel demarcador para escrita em vidro

4.1.23 Porta-filtro de aço inoxidável, diâmetro de 142 mm

4.1.24 Potenciômetro

Deve ter escala bem legível e medir com precisão mínima de 0,1 unidade de pH. A calibração do potenciômetro deve ser feita pelo menos duas vezes ao dia, com tampões de pH 4,0, pH 6,86 e pH 9,18.

4.1.25 Pré-filtro de fibra de vidro tipo AP-20, 142 mm de diâmetro

4.1.26 Refrigerador

Certificado para manter a temperatura na faixa de 2 a 8°C com capacidade para comportar recipientes com os meios de cultura e soluções a serem mantidas sob refrigeração. Periodicamente, devem ser feitas a limpeza e desinfecção.

4.1.27 Tubos de ensaio

Tubos de ensaio de borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com tampas de rosca e capacidade adequada para conter 10 mL do meio de cultura (usualmente são empregados tubos de ensaio de 16 mm x 150 mm).

4.1.28 Vasilhames de pressão com capacidade de 5 e 10 L

4.2 Meios de cultura e soluções

4.2.1 Reagentes

4.2.1.1 Para a preparação dos meios de cultura e soluções utilizadas neste ensaio são os seguintes, os reagentes necessários:

- a) Água bidestilada estéril.
- b) Álcool etílico comercial.
- c) Cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) p.a.
- d) Cloreto de potássio (KCl) p.a.
- e) Cloreto de sódio (NaCl) p.a.
- f) Dextrose.
- g) Fosfato de potássio (KH_2PO_4) p.a.
- h) Fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- i) Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a.
- j) Lactalbumina hidrolisada.
- k) Penicilina G-potássica cristalina.
- l) Sulfato de gentamicina.
- m) Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.
- n) Vermelho de fenol.

4.2.1.2 Os reagentes devem ser de grau bacteriológico e procedência idônea, apresentar odor, cor e consistência inalteradas. Uma vez feita a escolha dos reagentes, seu uso deverá ser padronizado e, quando possível, ser mantidos sem modificações posteriores. Datar os frascos de reagentes após recebimento e abrir ficha-controle na qual devem constar a data de chegada e todas as pesagens realizadas. Isto permite o controle do estoque de drogas existentes no laboratório.

4.2.2 Meios de cultura

4.2.2.1 Meio de Eagle

Ver Norma CETESB L5.501.

4.2.2.2 Meio de Eagle com 10% de soro fetal bovino inativado (meio de crescimento)

Ver Norma CETESB L5.501.

4.2.2.3 Meio de Eagle com 2% de soro fetal bovino inativado (meio de manutenção)

Ver Norma CETESB L5.501.

4.2.2.4 Meio Melnick "B"

Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.....	6,8 g
Cloreto de potássio (KCl) p.a.....	0,40 g
Fosfato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O) p.a.....	0,14 g
Cloreto de cálcio anidro (CaCl ₂) p.a.....	0,20 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O) p.a.....	0,20 g
Dextrose.....	1,0 g
Hidrolisado de lactalbumina.....	5,0 g
Vermelho de fenol.....	0,01 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) p.a.....	2,2 g
Água bidestilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes, dissolver em aproximadamente 800 mL de água bidestilada e completar para um volume final de 1 000,0 mL com água bidestilada. Esterilizar por filtração (item 4.3.1). Distribuir a solução filtrada em volumes de 500,0 mL e efetuar prova de esterilidade, colocando todos os frascos a 35°C durante 24-48 horas. Armazenar em congelador a -20°C.

4.2.3 Soluções

4.2.3.1 Álcool a 70%

Fórmula:

Álcool etílico comercial.....	700,0 mL
Água destilada (aproximadamente).....	300,0 mL

Preparo:

Medir 700,0 mL de álcool etílico comercial em recipiente adequado e adicionar uma quantidade de água (aproximadamente 200,0 a 300,0 mL) suficiente para obter uma solução com teor de 70% de álcool. Essa verificação é feita através do uso do alcoômetro.

4.2.3.2 Solução balanceada de Hanks - 10x concentrada

(1 litro 10x concentrada = 10 litros diluídos)

Nota: Esta solução é composta pelas soluções 1 e 2.

4.2.3.2.1 Solução 1

Fórmula:

Cloreto de sódio (NaCl).....	80,0 g
Cloreto de potássio (KCl).....	4,0 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂).....	1,4 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O):.....	2,0 g
Água bidestilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e dissolver cada um deles separadamente em pequenos volumes de água e, após dissolução, completar o volume total para 500,0 mL com água bidestilada.

4.2.3.2.2 Solução 2Fórmula:

Fosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O).....	1,2 g
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄).....	0,6 g
Dextrose (ou glicose).....	10,0 g
Vermelho de fenol a 1%.....	16,0 mL
Água bidestilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar os reagentes e dissolver cada um deles separadamente em pequenos volumes de água. Acrescentar o vermelho de fenol. Completar o volume total para 500,0 mL com água bidestilada.

4.2.3.2.3 Preparo final da solução balanceada de Hanks - 10x concentrada

Adicionar a solução 2 à solução 1, sob agitação. Diluir a 1:10 com água bidestilada. Esterilizar por filtração (item 4.3.1). Distribuir a solução filtrada em volumes de 500,0 mL, efetuando prova de esterilidade, colocando todos os frascos à temperatura de 35°C durante 24-48 horas. Armazenar em congelador a -20°C.

4.2.3.3 Solução de penicilina G-potássica cristalinaFórmula:

Penicilina G-potássica cristalina.....	10 milhões U
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada..	100,0 mL

Preparo:

Dissolver o conteúdo de um frasco com 100,0 mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada. Distribuir a solução em volumes de 50,0 mL. Armazenar em congelador a -20°C. Utilizar 0,1 mL para ca

da 100,0 mL de meio de cultura.

4.2.3.4 Solução de sulfato de gentamicina

Fórmula:

Sulfato de gentamicina (40 mg).....	1,0 mL
Solução balanceada de Hanks 1 x concentrada...	3,0 mL

Preparo:

Misturar o conteúdo de uma ampola com 3,0 mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada. Armazenar em congelador a -20°C . Utilizar 0,05 mL para cada 100,0 mL de meio de cultura.

4.3 Esterilização das soluções e meios de cultura

4.3.1 Filtração

A filtração de soluções ou de meios de cultura que contêm substâncias termolábeis é feita com pressão positiva usando-se membranas de éster de celulose acopladas, com as seguintes porosidades: $0,45\ \mu\text{m}$ e $0,22\ \mu\text{m}$. Membranas clarificantes de fibra de vidro podem também ser incluídas e, as de tipo AP-20 são as mais indicadas. A montagem das membranas deve ser feita obedecendo uma ordem decrescente de porosidade. Todos os materiais e equipamentos utilizados para a filtração deverão ser esterilizados previamente por autoclavação a 121°C durante 30 minutos.

4.3.2 Autoclavação

Esterilizações de soluções ou de meios de cultura em autoclave devem ser feitas em temperatura de 121°C durante 15 minutos. Durante a autoclavação de meios de cultura, não deve haver excesso de aquecimento para evitar uma sobrecarga térmica que possa produzir hidrólise, peptonação, caramelização ou outro tipo de destruição das substâncias que constituem os meios de cultura.

4.3.3 Armazenamento de soluções

As soluções são armazenadas em refrigerador (2 a 8°C) ou em congelador (-20°C). São mantidas em frascos bem fechados, com rolhas de borracha ou tampa com rosca, pois os tampões de algodão podem permitir a entrada e a conseqüente absorção de substâncias inespecíficas. Soluções alcalinas não devem ser estocadas em frascos de vidro por muito tempo, pois esses frascos são lentamente dissolvidos e íons de metais pesados são, posteriormente, encontrados nessas soluções.

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

Os vírus pertencentes ao gênero Enterovírus podem ser identificados por testes de neutralização com "pools" de anti-soros específicos. Deste modo, se um anti-soro específico para um tipo de vírus for colocado em contato com este vírus, ele o neutralizará, fazendo com que perca a capacidade infectante.

5.2 Procedimento

Todo o procedimento de identificação de vírus deve ser realizado em capela de fluxo laminar vertical.

5.2.1 Multiplicação do vírus

5.2.1.1 Decantar o meio de crescimento dos tubos contendo monocamadas de células BS-C-1, preparados como descrito na Norma CETESB L5.501.

5.2.1.2 Inocular então o conteúdo viral recolhido das placas obtidas pelo emprego da técnica de plaqueamento (Norma CETESB L5.502).

5.2.1.3 A seguir, incubar os tubos contendo cultura celular inoculada a 35°C durante 60 minutos, para facilitar a adsorção das partículas virais às células.

5.2.1.4 Após o período de incubação, acrescentar em cada tubo 1,5 mL de meio de manutenção líquido.

5.2.1.5 Incubar a 35°C durante 7 dias.

5.2.1.6 Ler diariamente ao microscópio, observando o aparecimento de efeito citopático nas culturas inoculadas.

5.2.1.7 Quando as culturas celulares apresentarem 75% de efeito citopático, congelar a -70°C, e descongelar 3 vezes cada tubo de ensaio, para maior liberação das partículas virais, procedendo em seguida à titulação viral.

5.2.1.8 Os tubos que não apresentarem efeito citopático após o período de incubação (7 dias) são congelados e descongelados 3 vezes e então inoculados novamente em culturas de células como descrito nos itens 5.2.1.1 a 5.2.1.6.

5.2.1.9 Após o período de incubação, os tubos que apresentarem efeito citopático são considerados positivos quanto à presença de vírus e tratados como descrito em 5.2.1.7. Os tubos que não apresentarem efeito citopático são considerados negativos e deverão então ser descartados.

5.2.2 Titulação de vírus (microtécnica)

5.2.2.1 Para titular os vírus isolados, fazer diluições ao décimo (10^{-1} a 10^{-6}) de cada um. Para tal, distribuir 4,5 mL de solução balanceada de Hanks 1 x concentrada em 6 tubos de ensaio.

5.2.2.2 Marcar cada um dos 6 tubos com a solução que lhe corresponde de 10^{-1} a 10^{-6}) e também com o número da amostra viral.

5.2.2.3 Colocar 0,5 mL da suspensão viral no tubo correspondente à diluição 10^{-1} e homogeneizar em agitador tipo Vortex.

5.2.2.4 Transferir 0,5 mL da diluição 10^{-1} para o segundo tubo (diluição 10^{-2}) e homogeneizar em agitador tipo Vortex.

5.2.2.5 Proceder da mesma forma até a diluição 10^{-6} .

5.2.2.6 Numerar a microplaca que vai ser inoculada, colocando o número da amostra e as respectivas diluições.

5.2.2.7 Inocular 25 μ L da primeira diluição 10^{-1} , em cada um dos 6 orifícios seqüenciais da microplaca.

5.2.2.8 Seguir o mesmo procedimento até a diluição 10^{-6} .

5.2.2.9 Inocular 0,1 mL de suspensão celular da linhagem celular BS-C-1 e 0,15 mL do meio de crescimento, em cada um dos orifícios que já contêm as respectivas diluições do vírus. Inocular os mesmos volumes de suspensão celular e meio de crescimento em dois orifícios vazios da microplaca, que serão os controles das células.

5.2.2.10 Incubar a microplaca a 35°C durante 7 dias em incubadora bacteriológica-CO₂.

5.2.2.11 Ler diariamente ao microscópio durante o período de incubação, observando o aparecimento de efeito citopatogênico nos orifícios inoculados.

5.2.2.12 Anotar os resultados conforme exemplifica a Tabela 1.

5.2.2.13 Anotar nas colunas da Tabela 1 o seguinte:

- a) na primeira coluna: diluição do vírus;
- b) na segunda coluna: o número de orifícios que apresentaram E.C.P. em cada diluição;
- c) na terceira coluna: o número de orifícios não infectados em cada diluição, isto é, sem E.C.P.;
- d) na quarta coluna: os valores acumulados dos orifícios infectados;

TABELA 1 - Leituras da titulação de vírus para cálculo do $DICT_{50}$

Diluições dos vírus	Orifícios infectados	Orifícios não infectados	Valores acumulados		
			Orifícios infectados	Orifícios não infectados	% de infecção
10^{-1}	6	0	17	0	100
10^{-2}	6	0	11	0	100
10^{-3}	4	2	5	2	71
10^{-4}	1	5	1	7	← Pi 13
10^{-5}	0	6	0	13	0
10^{-6}	0	6	0	19	0

Exemplo:

$$6 + 6 + 4 + 1 + 0 + 0 = 17$$

$$6 + 4 + 1 + 0 + 0 = 11$$

$$4 + 1 + 0 + 0 = 5$$

$$1 + 0 + 0 = 1$$

$$0 + 0 = 0$$

$$0 + 0 = 0$$

e) na quinta coluna: os valores acumulados dos orifícios não infectados;

Exemplo:

$$0 = 0$$

$$0 + 0 = 0$$

$$0 + 0 + 2 = 2$$

$$0 + 0 + 2 + 5 = 7$$

$$0 + 0 + 2 + 5 + 6 = 13$$

$$0 + 0 + 2 + 5 + 6 + 6 = 19$$

f) na sexta coluna: a porcentagem de infecção é calcula

da da seguinte maneira: divide-se o número de orifícios infectados de cada diluição pelo total de orifícios não infectados e infectados.

Exemplo:

$$\% = 17/17 \times 100 = 100$$

$$\% = 11/11 \times 100 = 100$$

$$\% = 5/7 \times 100 = 71$$

$$\% = 1/8 \times 100 = 12,5 \cong 13$$

$$\% = 0/13 \times 100 = 0$$

$$\% = 0/19 \times 100 = 0$$

5.2.2.14 O título é expresso como a dose infectante 50% em cultura de tecidos e é calculado segundo o método de Reed & Muench. Na titulação do vírus dada como exemplo (Tabela 1) 71% dos orifícios inoculados com a diluição 10^{-3} e 13% dos orifícios inoculados com a diluição 10^{-4} , apresentaram E.C.P. Portanto, a dose que causaria 50% de E.C.P. está entre 10^{-3} e 10^{-4} . O cálculo do ponto intermediário (p.i.) é feito do seguinte modo:

$$P.i. = \frac{(\% \text{ de infecção superior a } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de infecção superior a } 50\%) - (\% \text{ de infecção inferior a } 50\%)}$$

No exemplo da Tabela 1:

$$P.i. = \frac{71 - 50}{71 - 13} = + 0,36$$

$$DICT_{50} = 10^{3,0 + 0,36} = 10^{3,36/0,025} \text{ mL}$$

5.2.3 Reação de neutralização (microtécnica)

5.2.3.1 Reação de neutralização com o "pool" de anti-soros Lim e Benyesh-Melnick (A-H)

- a) reidratar cada um dos frascos que contêm os "pools" (A-H) com 5 mL de água bidestilada estéril;
- b) inativar os conteúdos dos frascos reidratados, em banho-maria a 56°C por 30 minutos;
- c) diluir o conteúdo de cada frasco do "pool" (A-H) a 1:10 com meio de cultura Melnick "B" (item 4.2.2.4);
- d) colocar 25 μL de cada um dos "pools" diluídos, em microplaca;

- e) colocar em cada um dos orifícios que já contém um dos "pools" (A-H) 25 μ L do vírus a ser identificado, os quais devem conter $10^{3,0 \pm 0,5}$ DICT₅₀/0,025 mL (título calculado previamente);
- f) incubar a microplaca contendo vírus e "pool" por 60 minutos a 35°C para promover a neutralização;
- g) após este período de incubação, inocular 0,1 mL de suspensão celular da linhagem BS-C-1 em cada um dos orifícios que já contém o complexo antígeno-anticorpo;
- h) adicionar a cada orifício inoculado, 0,15 mL do meio de crescimento, iniciando pelos orifícios de controle de células;
- i) incubar a microplaca a 35°C por 7 dias em incubadora bacteriológica - CO₂; e
- j) ler diariamente ao microscópio, para verificar a ocorrência ou não de efeito citopático nos orifícios inoculados.

5.2.3.2 Reação de neutralização com o "pool" de anti-soros LIm e Benyesh-Melnick (J-P)

- a) reidratar cada um dos frascos que contém os "pools" (J-P) com 5 mL de meio de cultura Melnick "B" (item 4.2.2.4);
- b) inativar o conteúdo dos frascos reidratados em banho-maria a 56°C por 30 minutos;
- c) colocar 25 μ L de cada "pool" em orifícios da microplaca;
- d) colocar em cada um dos orifícios que já contém um dos "pools" (J-P), 25 μ L do vírus a ser identificado, os quais devem conter a $10^{3,0 \pm 0,5}$ DICT₅₀/0,025 mL (título previamente calculado);
- e) incubar a microplaca contendo vírus e "pool" por 60 minutos a 35°C para promover a neutralização;
- f) após o período de incubação, inocular 0,1 mL de suspensão celular BS-C-1 em cada um dos orifícios que já contém o complexo antígeno-anticorpo;
- g) adicionar a cada orifício inoculado 0,15 mL do meio de crescimento, iniciando pelos orifícios de controle de células;
- h) incubar a microplaca a 35°C por 7 dias em incubadora bacteriológica - CO₂;
- i) ler diariamente ao microscópio, para verificar a ocorrência ou não de efeito citopático nos orifícios inoculados.

5.2.3.3 Testes especiais de neutralização

Se o vírus a ser identificado não tiver sido neutralizado por nenhum dos anti-soros específicos contidos nos "pools" A-H, ele ainda deve rá ser testado frente aos anti-soros específicos para vírus Coxsackie B-3 e ECHO-11-12, conforme o seguinte procedimento:

a) anti-soro para vírus Coxsackie B-3:

- reidratar o frasco que contém o anti-soro CB-3 com 2 mL de água bidestilada estéril;
- diluir o conteúdo do frasco a 1:80 com meio de cultura Melnick "B" (item 4.2.2.4);
- colocar 25 μ L do "pool" diluído em cada um dos orifícios da microplaca;
- acrescentar a cada um destes orifícios da microplaca 25 μ L do vírus a ser identificado, os quais deverão conter $10^{3,0 \pm 0,5}$ DICT₅₀/0,025 mL (título calculado previamente);
- seguir o mesmo procedimento contido nos itens 5.2.3.1 f até j.

b) anti-soro para vírus ECHO-11:

- reidratar o frasco que contém o anti-soro E-11 com 2 mL de água bidestilada estéril;
- diluir o conteúdo do frasco a 1:40 com meio de cultura Melnick "B" (item 4.2.2.4);
- colocar 25 μ L de "pool" diluído em cada um dos orifícios;
- acrescentar a cada um destes orifícios 25 μ L do vírus a ser identificado, os quais deverão conter $10^{3,0 \pm 0,5}$ DICT₅₀/0,025 mL (título calculado previamente);
- seguir o mesmo procedimento contido nos itens 5.2.3.1 f até j.

c) anti-soro para vírus ECHO-12:

- reidratar o frasco que contém o anti-soro E-12 com 2 mL de água bidestilada estéril;
- diluir o conteúdo do frasco a 1:520 com meio de cultura Melnick "B" (item 4.2.2.4);
- colocar 25 μ L de "pool" diluído em cada um dos orifícios;
- acrescentar a cada um destes orifícios 25 μ L do vírus a ser identificado, os quais deverão conter $10^{3,0 \pm 0,5}$

- DICT₅₀/0,025 mL (título calculado previamente);
- seguir o mesmo procedimento contido nos itens 5.2.3.1 f até j.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos na neutralização são comparados com os esquemas de identificação contidos nas Tabelas 2 e 3.

Observação: Os 8 "pools" (A-H) preparados pelo NIH (National Institute of Health, EUA) identificam 37 Enterovírus. Poliovírus 1, 2, 3, Coxsackie A 7, 9 e 16, Coxsackie B 1, 2, 4 a 6, ECHO 1 a 7, 9, 13 a 21, 24 a 27 e 29 a 33.

A identificação dos vírus Coxsackie B3 e dos ECHO 11 e 12 requer testes especiais. Os vírus ECHO 22 e 23 são identificados pelo uso do "pool" E22 e E23, respectivamente. Os "pools" (J-P) também preparados pelo NIH identificam 14 vírus Coxsackie A (tipos 1, 2, 4 a 6, 10, 12 a 14 e 18 a 22). Como podem ocorrer duas neutralizações cruzadas entre os vírus Coxsackie A₃ e A₈ e anti-soro, e entre os vírus Coxsackie A₁₁ e A₁₅ e anti-soro, testes com soros monoespecíficos são recomendados para a sua identificação.

/TABELA 2

/TABELA 2

TABELA 2 - "Pools" A-H

Neutralização pelo "Pool" (a)	Identidade do vírus	Neutralização pelo "Pool"	Identidade do vírus
A	E 15	DE	E 13
AB	CA 7	DF	E 14
AC	CB 1	DG	E 16
AD	E 33	DH	P 3
AE	CB 4	DEH	E 32
AF	E 7	E	E 11 (b)
AG	E 4	EF	E 18
AH	E 1	EG	E 17
ACF	E 29	EH	E 22 (e)
AEG	E 5 (b)	F	E 27
B	E 21	FG	E 20
BC	E 2	FH	CB 6
BD	CB 2	G	E 31
BE	P 2	GH	E 23 (e)
BF	E 19	H	CA 16
BG (c)	CA 9 (c)		
BH	E 3		
BDF	E 26		
BFH	E 9		
C	E 24		
CD	E 6		
CE	CB 5		
CF	P 1		
CH	E 12 (d)		
CEG	E 30		
D	E 25		

- Notas:
- a) O anti-soro CB3 não aparece em nenhum dos "pools". A neutralização de um Enterovírus isolado, pelos "pools" A-H sugere que para tal vírus pode ser feito um teste especial (5.2.3.3.a).
 - b) Os "pools" AEG contêm o anti-soro E₅ que pode dar reação de neutralização heterotípica como o vírus E₁₁. Para distingui-los deve ser feito um teste especial(5.2.3.3.b). Se ocorrer neutralização, o vírus é identificado como ECHO 11; caso contrário, o vírus é identificado como ECHO 5.
 - c) O vírus CA₉ pode ser identificado por neutralização total pelos "pools" B e G e por neutralização branda (ou não neutralização) pelo "pool" C. O "pool" C contém inadvertidamente 10 unidades de anticorpos contra o vírus CA₉.
 - d) Pode ocorrer neutralização heterotípica do vírus E₁₂ pelos "pools" A, E, F e G. Para identificação definitiva do vírus E₁₂ deve ser feito um teste especial (5.2.3.3.c).
 - e) Neutralização pelos "pools" E, G e H indica que o vírus isolado pode ser o E₂₂ ou o vírus E₂₃. Para identificá-los, usar os "pools" E₂₂ e E₂₃, respectivamente.

/TABELA 3

Tabela 3 - "Pools" J-P

Neutralização pelo "Pool"	Identidade do vírus
J	CA 1
KL	CA 2
OP (a)	CA 3
JP	CA 4
JN	CA 5
L	CA 6
P (a)	CA 8
O	CA 10
KN (b)	CA 11
JMN	CA 12
M	CA 13
JO	CA 14
K (b)	CA 15
KO (c)	CA 17
LM	CA 18
MP	CA 19
JL	CA 20
MN	CA 21
LO	CA 22

- Notas:
- Confirmar a identificação usando soros monoespecíficos CA 3 e CA 8;
 - Confirmar a identificação usando soros monovalentes CA 11 e CA 15;
 - O vírus CA 17 pode também ser neutralizado pelos "pools" heterologos J, L, M e N em testes em camundongos. A identificação final deve ser feita com soro monovalente A17. Se ocorrer neutralização, o vírus é ECHO 11, senão o vírus é ECHO 5.

ANEXO A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

A-1 Os "pools" de anti-soros específicos para identificação de Entero-vírus são obtidos do National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20024, EUA, acompanhados de Manual de Instruções.

B-2 Os "pools" J-P de Lim e Benyesh-Melnick consistem de 19 anti-soros de equino, específicos para vírus Coxsackie tipo A, combinados em 7 "pools" e cada "pool" contendo 4-6 anti-soros. Os "pools" têm sido designados de tal forma que um determinado anti-soro aparece em um, dois ou três "pools". Os sete "pools", preparados em 1974 no NIH, corretamente identificam 14 Coxsackievírus do grupo A (tipos 1,2, 4-6, 10, 12-14, 18-22).

/ANEXO B

ANEXO B - PROCEDIMENTOS COMPLEMENTARESB-1 Cuidados especiais com a lavagem e preparo do material

Devem ser obedecidas as prescrições da Norma CETESB M1.002.

B-2 Controle da eficiência da autoclave

Utilizar ampolas com suspensão de esporos Bacillus stearothermophilus em meio de cultura, colocando-os entre os frascos ou entre os materiais a serem esterilizados. Estas ampolas, depois da autoclavação, são incubadas em banho-maria, a 55°C durante 24-48 horas. Se houver mudança da coloração da suspensão contida nas ampolas, de roxa para amarela, significa que a esterilização foi insuficiente, pois houve desenvolvimento de bactérias.

B-3 Controle de qualidade dos meios de cultura

Ver Norma CETESB L5.216.

B-4 Controle da qualidade da água destilada

A água destilada a ser empregada em laboratórios de virologia deve ser de alta qualidade, livre de substâncias tóxicas ou nutritivas que possam influenciar na sobrevivência e crescimento de microrganismos. É recomendável a avaliação periódica de sua qualidade, através da realização de testes específicos (ver Norma CETESB L5.212) - Prova de adequabilidade da água destilada para fins microbiológicos).

B-5 Controle da adequabilidade biológica da água bidestilada

Devem ser efetuados testes de adequabilidade biológica da água bidestilada para garantir a produção de uma água de alta qualidade livre de substâncias tóxicas ou nutrientes que possam interferir nos ensaios virológicos (ver Norma CETESB L5.215).

B-6 Armazenamento da água bidestilada

A água bidestilada deve ser armazenada em frascos limpos de vidro neutro, de preferência ao abrigo da luz e protegidos de pó ou vapores que possam ser produzidos no laboratório. O armazenamento prolongado da água bidestilada deve ser evitado.

B-7 Local de trabalho

B-7.1 As capelas de segurança biológica devem estar localizadas em áreas de movimento reduzido livres de poeiras. Não deve haver movimentação excessiva do ar devido ao uso de ventiladores, exaustores, etc. Conversa desnecessária deve ser evitada.

B-7.2 A limpeza da sala é feita após o expediente diário sem varrer

ções exageradas e, de preferência, empregando solução de formalina ou de outro desinfetante. Chão, mesas e balcões são limpos diariamente. No fim da semana, realiza-se uma limpeza mais rigorosa, inclusive do teto e das paredes. Após a limpeza, o ambiente é impregnado com formol puro, que é colocado em placas de Petri para evaporar.

B-7.3 Se a capela estiver instalada em local com ar condicionado, a entrada de ar não deve ser dirigida diretamente sobre o campo de trabalho, a não ser que o condicionador tenha um filtro de ar especial.

B-8 Precauções

Dentre as pessoas que trabalham no laboratório, aquelas que têm menor tempo de treinamento e as que estão mais diretamente associadas a manobras com material infectado são as que apresentam maiores possibilidades de ser infectadas acidentalmente. A inalação de aerossóis, a aspiração de soluções contaminadas através de pipetas, acidentes de centrifugação, etc., provocam, comprovadamente, grande número de infecções acidentais e devem ser prevenidas pelo uso de máscaras descartáveis de papel, pipetadores e pela obediência às instruções específicas de trabalho e de uso do equipamento (ver Norma CETESB L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia).

B-8.1 Material de segurança

B-8.1.1 Aventais de plástico

Devem ser de plástico resistente e de comprimento adequado para a proteção do técnico durante os processos de lavagem.

B-8.1.2 Aventais de tecido

Para uso obrigatório por todos os técnicos na execução de quaisquer atividades laboratoriais.

B-8.1.3 Luvas de amianto

ANEXO C - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- C-1 Berg, G.; Bodily, H.L.; Lennette, E.H.; Melnick, J.L.; Metcalf, T.G. Viruses in Water. Washington, American Public Health Association, 1976.
- C-2 Bier, G.O.; Mota, I.; Dias da Silva, W.; Vaz, N.M. Imunologia básica e aplicada. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977.
- C-3 Conrath, T.B. Handbook of microtiter procedurs. Cambridge, Dynatech, 1972.
- C-4 Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. Microbiology. Philadelphia, Harper & Row, 1980.
- C-5 Hsiung, G.D. Diagnostic Virology. New York, Yale University.
- C-6 Labzoffsky, N.A. Isolation and identification of viruses. Laboratories Manual in Virology, Ontário, Dept of Health, Canada, 1968.
- C-7 Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. Diagnostic procedures for Viral, rickettsial and chlamydial infections. 5 ed. Washington, American Public Health Association, 1979.
- C-8 Lepine, P - Techniques de laboratoire em virologie humaine Saint Germain, Maisson & Cia. Editeurs, 1964.
- C-9 Mathews, R.E.F. Viral taxonomy for the nonvirologist. Annu. Rev. Microbiol., 39: 451-471, 1985.
- C-10 Melnick, J.L. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: VIROLOGY. Ed. B.N. Fields. New York, Raven Press, 1985. p. 739-794.
- C-11 Melnick, J.L. Rennick, V.; Hampil, B.; Schmidt, N.J.; Ho, H.H. Syophilized combination pools of enteroviruses equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. Bull. W.H.O., 48: 263-268, 1973.

C-12 Reed, L.J. & Müench , H. A simple method of estimating fifty per cent and points. Am. J. Hyg., 27: 493-497, 1088.

C-13 Schmidt, N.J.; Ho, H.H.; Riggs, J.L.; Lennette. E.H. Comparative sensitivity of varions cell culture systems for isolation of viruses from wastewater and fecal sample. Appl. Environ. Microbiol., 36: 487-491, 1978.
