

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÕES VÍRICAS EM
CÃES DE SANTA MARIA, RS; E SELEÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES
RESISTENTES AO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL
BOVINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Renata Dezengrini

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÕES VÍRICAS EM CÃES
DE SANTA MARIA, RS; E SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE LINHAGENS CELULARES RESISTENTES AO VÍRUS DA
DIARRÉIA VIRAL BOVINA**

Por

Renata Dezengrini

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Eduardo Furtado Flores, PhD

Santa Maria, RS, Brasil
2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÕES VÍRICAS EM CÃES DE
SANTA MARIA, RS; E SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LINHAGENS CELULARES RESISTENTES AO VÍRUS DA DIARRÉIA
VIRAL BOVINA**

Elaborada por
Renata Dezengrini

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Eduardo Furtado Flores, PhD, UFSM
(Presidente/Orientador)

Luciane Terezinha Lovato, PhD, UFSM

Silvia de Oliveira Hübner, Dr., UFPel

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2006.

AGRADECIMENTOS

Especialmente ao professor Eduardo Furtado Flores pelo encaminhamento na área de virologia, por estar sempre presente, disposto a ajudar, ouvir e ensinar, pela amizade e exemplo como profissional;

Aos meus pais, Irineu e Juraci Dezengrini, meu irmão Rodrigo Dezengrini e meu namorado Juliano Rasquin Shessarenko pelo incentivo em prosseguir meus estudos, pela confiança, amor, carinho e apoio demonstrados sempre;

À prof. Luciane Terezinha Lovato pelos ensinamentos, pelo incentivo, e amizade demonstrados em nosso convívio;

Ao professor Rudi pelos ensinamentos, pela orientação e auxílio na redação da dissertação e por sua dedicação ao Setor de Virologia, possibilitando a realização de nossos trabalhos;

A todos os meus amigos e colegas de mestrado do Setor de Virologia, especialmente ao Marcelo de Lima, ao Mário Celso S. Brum e ao Diego G. Diel, pelo auxílio nos experimentos, pelo companheirismo e amizade demonstrados;

Aos colegas de mestrado Érika T. Fonseca, Mariana Sá e Silva, Daniel C. M. Müller e Soraia F. de Souza pelo auxílio nas coletas de amostras durante as campanhas de vacinação contra a raiva;

Aos bolsistas de iniciação científica que muito contribuíram durante as campanhas de vacinação, também pela convivência e os momentos de descontração e amizade;

À Universidade Federal de Santa Maria agradeço pela formação acadêmica e científica;

À CAPES, CNPq, FAPERGS, FINEP (PRONEX em Virologia Veterinária) pelo suporte financeiro que viabilizou a realização dos trabalhos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SOROPREVALÊNCIA DE INFECÇÕES VÍRICAS EM CÃES DE SANTA MARIA, RS; SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES RESISTENTES AO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA

AUTORA: RENATA DEZENGRINI

ORIENTADOR: EDUARDO FURTADO FLORES

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2006.

O presente trabalho relata um inquérito sorológico das principais infecções víricas de cães em Santa Maria, RS, Brasil e a obtenção de linhagens celulares de origem canina, suína e leporina resistentes ao vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). As infecções pelo vírus da cinomose (CDV), parvovírus (CPV), adenovírus (CAV) e coronavírus (CCoV) são importantes causas de morbidade e de mortalidade em cães em todo o mundo. Com o objetivo de determinar a prevalência de anticorpos contra esses vírus na população canina da cidade de Santa Maria, coletou-se amostras de sangue de 817 cães não-vacinados, em 14 bairros. Estas foram testadas pela técnica de soroneutralização (CDV, CAV e CCoV) ou inibição da hemaglutinação (CPV). Anticorpos específicos contra o CDV foram detectados em 27,3% (223/817) das amostras, contra o CPV em 68,7% (561/817), contra o CAV em 43% (353/817) e contra o CCoV em 50,4% (412/817) dos cães. Esses resultados demonstram que esses vírus estão difundidos na população canina dos bairros da cidade. Por outro lado, demonstram também que uma parte considerável da população é soronegativa e, portanto está desprotegida contra esses agentes, indicando a necessidade de se ampliar os programas de vacinação para essas infecções. Durante a padronização das técnicas sorológicas e expansão dos cultivos celulares para amplificação dos vírus, detectou-se a contaminação da linhagem de células caninas MDCK com o BVDV, o principal vírus contaminante de cultivos celulares. A contaminação inadvertida de cultivos celulares com o BVDV pode representar um sério problema para o diagnóstico virológico, pesquisa e produção de imunobiológicos. A segunda parte dessa dissertação descreve a produção e caracterização de três linhagens celulares resistentes ao BVDV, obtidas a partir das células parentais de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e leporina (RK-13) que estavam contaminadas com o BVDV. Essas células foram submetidas a quatro ciclos de infecção com uma cepa citolítica de BVDV. As células que sobreviveram a infecção lítica foram clonadas, expandidas e testadas para a sua susceptibilidade ao BVDV e outros vírus de interesse. A resistência ao BVDV foi investigada pela pesquisa de antígenos

virais por imunofluorescência indireta e por cocultivo com células susceptíveis após a inoculação do vírus em altos títulos. As três linhagens celulares demonstraram ser resistentes a três cepas-padrão (Singer, NADL e Oregon) e a 10 isolados de campo do BVDV. A inoculação do BVDV nessas células com uma multiplicidade de infecção de 10 DICC₅₀/célula resultou em frequências de infecção de $<10^{-5}$ para as células MDCK-R e PK-15R; e de $3,3 \times 10^{-4}$ para as células RK-13R. Comparando-se com as células parentais, verificou-se que as linhagens resistentes são >10.000 (MDCK-R), >20.000 (PK-15R) e 600 (RK-13R) vezes menos susceptíveis ao BVDV. A inoculação do vírus nas células resistentes na presença de polietilenoglicol (PEG) resultou em um aumento na susceptibilidade dessas células na ordem de >437 (MDCK-R), >346 (PK-15R) e 87 vezes (RK-13R). Esses resultados indicam que a resistência dessas linhagens ao BVDV reside em um bloqueio na penetração do vírus, que pode ser parcialmente revertido pela adição do PEG. Por outro lado, cada linhagem resistente conservou a susceptibilidade a outros três vírus que replicam nas células parentais. Essas características tornam essas linhagens celulares potencialmente úteis para o diagnóstico, amplificação de vírus e produção de vacinas, sem o risco de contaminação acidental com o BVDV.

Palavras-chave: vírus da cinomose, parvovírus canino, adenovírus canino, coronavírus canino, contaminação celular, células resistentes.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SEROPREVALENCE OF VIRAL INFECTIONS IN DOGS OF SANTA MARIA, RS; SELECTION AND CHARACTERIZATION OF CELL LINES RESISTANT TO BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS

AUTHOR: RENATA DEZEGRINI

ADVISER: EDUARDO FURTADO FLORES

Santa Maria, February, 20th, 2006.

The present study reports a serologic survey of the main viral infections of dogs in Santa Maria, RS, Brazil, and the production of cell lines of canine, swine and leporine origin resistant to bovine viral diarrhea virus (BVDV). Canine distemper virus (CDV), parvovirus (CPV), adenovirus (CAV) and coronavirus (CCoV) infections have been associated with significant morbidity and mortality among dogs worldwide. The aim of this study was to determine the prevalence of antibodies against these viruses in the canine population of Santa Maria. To this purpose, 817 blood samples were collected from non-vaccinated dogs of 14 neighborhoods and tested by virus neutralization (CDV, CAV and CCoV) and by hemagglutinating inhibition (CPV). Specific antibodies to CDV were detected in 27.3% (223/817) of the samples, to CPV in 68.7% (561/817), to CAV in 43% (353/817) and to CCoV in 50.4% (412/817) of the dogs. These results indicate that CDV, CPV, CAV and CCoV infections are spread among dogs in Santa Maria. However, a significant part of the population is seronegative and therefore unprotected against these viruses. This indicates a need for extending the vaccination programs against these viruses. During the standardization of serologic tests and expansion of cell cultures for virus amplification, the canine MDCK cell line was found to be contaminated with BVDV, the main viral contaminant of cultured cells. The inadverted contamination of cultured cells with BVDV may represent a serious problem for diagnostic virology, research and production of biologicals. The second part of this dissertation reports the production and characterization of three cell lines resistant BVDV, obtained out of each parental cell line (canine MDCK, porcine PK-15 and leporine RK-13) that were contaminated with BVDV. Initially, the cells were submitted to four rounds of infection with a highly cytolytic BVDV strain. The cells surviving infection were then cloned out, expanded and assayed for their susceptibility to BVDV. The resistance to BVDV was investigated by search for viral proteins by immunofluorescence and by cocultivation with

susceptible cells following inoculation of BVDV at high titers. All three cell lines were resistant to three standard BVDV strains (Singer, NADL e Oregon) and 10 field isolates. Inoculation of these cells with BVDV at a multiplicity of infection of 10 TCID₅₀/cell resulted in frequencies of infection of $<10^{-5}$ for MDCK-R and PK-15R cells and of $3,3 \times 10^{-4}$ for RK-13R. Compared to the parental ones, the resistant cells were >10.000 (MDCK-R), >20.000 (PK-15R) and 600 (RK-13R) times less susceptible to BVDV. The inoculation of virus in the resistant cells in the presence of polyethylene-glicol (PEG) resulted in an increase in susceptibility in the order of >437 (MDCK-R), >346 (PK-15R) and 87 (RK-13R) times. These results indicate that the resistance of these cell lines is probably due to a block in viral entry which can be overcome by addition of PEG. On the other hand, each resistant cell line retained the susceptibility to other three viruses of interest which replicate in the parental cells. Thus, these cells may be useful for virology diagnostic, virus propagation and for vaccine production, without the risk of being inadvertently contaminated with BVDV.

Keywords: canine distemper virus, canine parvovirus, canine adenovirus, canine coronavirus, cell contamination, resistant cells.

LISTA DE FIGURAS

2. CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Amostras positivas para anticorpos contra os vírus da cinomose, parvovírus canino, adenovírus canino e coronavírus canino, individuais e para mais de um vírus..... 34

FIGURA 2. Frequência dos títulos de anticorpos contra o vírus da cinomose (CDV; A), parvovírus canino (CPV; B), adenovírus canino (CAV; C) e coronavírus canino (CCoV; D) em cães não-vacinados de Santa Maria, RS, Brasil. SN – soroneutralização, HI – inibição da hemaglutinação..... 35

3. CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Imunofluorescência indireta de células MDBK, CRIB, MDCK, PK-15 e RK-13, parentais e resistentes, inoculadas com a cepa Singer do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 10 (ampliação 320X)... 58

FIGURA 2. Título viral (DICC₅₀/mL) nas linhagens parentais e resistentes após a inoculação com diferentes vírus. A) MDCK: adenovírus canino (CAV-2), vírus da cinomose (CDV) e parvovírus canino (CPV); B) PK-15: vírus da doença de Aujeszky (PRV), parvovírus suíno (PPV) e enterovírus suíno (PEV-3); C): RK-13 herpesvírus equino (EHV-1), herpesvírus de coelhos (RHV) e vírus da arterite viral equina (EVAV). Os valores referem-se à média de três repetições..... 59

LISTA DE TABELAS

2. CAPÍTULO 1

TABELA 1. Anticorpos contra o vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV) em cães não-vacinados de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, de acordo com o bairro ou local de coleta.... 33

TABELA 2. Anticorpos contra o vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV) em cães não-vacinados de Santa Maria, RS, Brasil, por atributo e fator de risco..... 34

3. CAPÍTULO 2

TABELA 1. Caracterização das linhagens celulares resistentes ao vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) obtidas a partir de linhagens celulares de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e leporina (RK-13)..... 56

TABELA 2. Efeito do polietilenoglicol (PEG) na infecção das linhagens celulares de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e leporina (RK-13), parentais e resistentes, pelo BVDV..... 57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CAPÍTULO 1. SOROPREVALÊNCIA DAS INFECÇÕES PELO VÍRUS DA CINOMOSE, PARVOVÍRUS CANINO, ADENOVÍRUS CANINO E CORONAVÍRUS CANINO EM CÃES DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.....	15
Resumo.....	16
Abstract.....	17
Introdução.....	17
Material e métodos.....	21
Resultados e discussão.....	22
Fontes de aquisição.....	29
Referências.....	29
3. CAPÍTULO 2. SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES DE ORIGEM CANINA, SUÍNA E LEPORINA RESISTENTES AO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA.....	37
Resumo.....	38
Abstract.....	39
Introdução.....	40
Material e métodos.....	43
Resultados e discussão.....	46
Fontes de aquisição.....	52
Referências.....	53

4. CONCLUSÕES.....	60
5. REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

As doenças víricas estão entre as principais enfermidades da espécie canina e são responsáveis por índices consideráveis de morbidade e de mortalidade em cães de todo o mundo. As infecções pelo vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV) estão entre as principais viroses de cães. O conhecimento da ocorrência, níveis de prevalência, distribuição temporal e espacial das infecções virais dessa espécie possui grande utilidade para indicar a necessidade do uso de vacinas e outras medidas de controle.

A cinomose é a principal doença viral dos cães, sendo descrita desde 1809 e apresentando distribuição mundial (MURPHY et al., 1999). A doença é causada por um *morbillivirus*, pertencente à família *Paramyxoviridae* (APPEL & SUMMERS, 1999). Os sinais clínicos da doença variam com a cepa viral, imunidade e com a idade dos cães e incluem febre bifásica, sinais gastrointestinais, respiratórios, neurológicos e lesões cutâneas (BIRCHARD & SHERDING, 1998).

O CPV pertence à família *Parvoviridae*, gênero *parvovirus*, e foi descrito pela primeira vez em 1978. O CPV é semelhante ao vírus da panleucopenia felina, sendo considerado o mais importante agente etiológico de gastroenterite em cães (APPEL & PARRISH, 1987; TRUYEN, 2000). A parvovirose canina é uma das principais enfermidades víricas de cães, principalmente pela sua ampla distribuição e grande morbidade e mortalidade (TRUYEN, 2000).

O CAV é um *mastadenovirus* pertencente à família *Adenoviridae*, descrito inicialmente como agente causal de hepatite canina (GOCKE et al., 1967). A hepatite infecciosa canina é uma doença aguda e fatal, caracterizada por sinais respiratórios, oculares, icterícia, diátese hemorrágica, encefalopatia e nefrite intersticial, causada pelo CAV-1 (BIRCHARD & SHERDING, 1998). O CAV-2 é um dos agentes virais envolvidos na etiologia da traqueobronquite infecciosa (FORD & VADEN, 1998). O CAV-1 e o CAV-2 são antigenicamente relacionados, apresentando 75% de homologia na sequência genômica e reatividade sorológica cruzada (HU et al., 2001).

O coronavírus canino (CCoV) pertence à família *Coronaviridae*, gênero *coronavirus* e causa gastroenterite leve a moderada, em surtos esporádicos em cães (PRATELLI, 2005). A primeira descrição da infecção pelo CCoV foi realizada em 1974, durante uma epizootia na Alemanha (BINN et al., 1974). Cães de todas as idades são

susceptíveis à infecção, no entanto os filhotes apresentam sinais clínicos mais severos, como anorexia, depressão, vômito e diarreia, que persistem por sete a dez dias (PRATELLI, 2005). Enquanto o CPV causa sinais frequentemente severos e fatais, o CCoV causa doença mais branda ou infecções subclínicas, e na ausência de infecções secundárias, os filhotes se recuperam em poucos dias (PRATELLI et al., 1999).

No Brasil, relatos clínicos e patológicos, além de alguns estudos sorológicos, indicam que essas viroses caninas ocorrem com frequência. No entanto são escassos os relatos a respeito de infecção natural e estudos sistemáticos de prevalência de anticorpos contra esses vírus na população canina do país.

O presente trabalho teve como objetivo inicial a determinação da prevalência de anticorpos contra esses agentes na população de cães de Santa Maria, RS. No entanto, por ocasião da padronização das técnicas sorológicas e expansão dos cultivos celulares para amplificação dos vírus e realização dos testes de soroneutralização viral, identificou-se a contaminação das células MDCK com o vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

A contaminação de cultivos celulares com vírus adventícios se constitui em um grande problema para laboratórios que utilizam células de cultivo para diagnóstico, pesquisa e produção de imunobiológicos (FROMMER et al., 1993). Embora contaminações com vários vírus já tenham sido relatadas, o BVDV é considerado o principal contaminante de cultivos celulares (BOLIN et al., 1994; WESSMAN & LEVINGS, 1999; AUDET et al., 2000). A origem mais comum da contaminação pelo BVDV é o soro fetal bovino (SBF) utilizado como promotor de crescimento celular (LEVINGS & WESSMAN, 1991; AUDET et al., 2000). O BVDV é um vírus RNA de fita simples, polaridade positiva, com envelope, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *pestivirus* e está amplamente distribuído na população bovina (BAKER, 1995).

A contaminação inadvertida de cultivos celulares com o BVDV pode interferir em resultados de diagnóstico e pesquisa, além de resultar em contaminação de estoques de outros vírus amplificados nesses cultivos (BOLIN et al., 1991). Por essas razões, o risco de contaminação de cultivos celulares pelo BVDV e outros pestivirus tem merecido especial atenção e monitoramento contínuos (BOLIN et al., 1991; FROMMER et al., 1993; AUDET et al., 2000). Não obstante, contaminações acidentais pelo BVDV continuam a ocorrer e grande parte das células depositadas nos bancos comerciais de linhagens celulares encontra-se contaminada (NUTTALL et al., 1977; BOLIN et al., 1994).

A obtenção de linhagens celulares resistentes aos pestivírus, porém susceptíveis a outros vírus de interesse, surgiu como uma alternativa para a problemática dessas contaminações. Uma linhagem de células de rim de bovino resistente ao BVDV (CRIB) foi obtida a partir da linhagem universal MDBK. Essa linhagem tem sido utilizada por vários laboratórios em diagnóstico virológico e pesquisa para multiplicação de outros vírus e inclusive para a produção de vacinas.

Utilizando-se a mesma metodologia descrita por FLORES & DONIS (1995) para a obtenção da linhagem CRIB, procurou-se obter linhagens celulares livres e resistentes ao BVDV. Essas linhagens foram obtidas a partir das linhagens parentais de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e de coelhos (RK-13) previamente contaminadas com o BVDV. As células MDCK resistentes ao BVDV demonstraram a sua utilidade ao serem utilizadas para multiplicação de vírus caninos e testes de soroneutralização viral, métodos empregados no estudo sorológico realizado como parte desse trabalho.

Essa dissertação divide-se em dois capítulos: o capítulo 1 relata um inquérito sorológico das principais infecções víricas de cães de Santa Maria, RS; o capítulo 2 descreve a produção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao BVDV, um importante contaminante de cultivos celulares.

2. CAPÍTULO 1

Seroprevalência das infecções pelo vírus da cinomose, parvovírus canino, adenovírus canino e coronavírus canino em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Seroprevalence of canine distemper virus, canine parvovirus, canine adenovirus and canine coronavirus infections in dogs of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Renata Dezengrini¹, Sara Campos da Silva², Diego Gustavo Diel¹, Erika Toledo da Fonseca¹, Rudi Weiblen³, Eduardo Furtado Flores^{3*}

(Artigo submetido à revista Ciência Rural, 2006).

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fone/fax: 55-3220-8034. E-mail: flores@ccr.ufsm.br. *Autor para correspondência.

RESUMO

As infecções pelo vírus da cinomose (CDV), parvovírus (CPV), adenovírus (CAV) e coronavírus (CCoV) são importantes causas de morbidade e de mortalidade em cães em todo o mundo. Estudos clínico-patológicos e sorológicos têm demonstrado que esses vírus estão presentes na população canina do Brasil, porém pouco se sabe sobre a sua incidência e prevalência. O presente trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de anticorpos contra esses vírus na população canina de Santa Maria, RS, Brasil. Para isso, amostras de sangue de 817 cães não-vacinados foram coletadas em 14 bairros durante a Campanha de vacinação anti-rábica de 2004 e 2005 e testadas pela técnica de soroneutralização (CDV, CAV e CCoV) ou inibição da hemaglutinação (CPV). Anticorpos contra o CDV foram detectados em 27,3% (223/817) das amostras, contra o CPV em 68,7% (561/817), contra o CAV em 43% (353/817) e contra o CCoV em 50,4% (412/817) dos cães. Observou-se um aumento gradativo da prevalência de anticorpos de acordo com a idade para o CDV, CAV e CCoV. Os índices de positividade para o CPV, CAV e CCoV foram um pouco superiores entre machos, e semelhantes entre os sexos para o CDV. Os animais que convivem com outros cães em casa ou na rua apresentaram prevalência maior de anticorpos para o CDV e CCoV do que cães sem contato ou convívio, enquanto para o CPV e CAV não houve diferença. Esses resultados demonstram que esses vírus estão difundidos na população canina dos bairros da cidade. Por outro lado, demonstram também que uma parte considerável da população é soronegativa e, portanto, está desprotegida frente a esses agentes, indicando a necessidade de se ampliar os programas de vacinação.

Palavras-chave: *vírus da cinomose, parvovírus, adenovírus, coronavírus, cães, epidemiologia, soroprevalência.*

ABSTRACT

Canine distemper virus (CDV), parvovirus (CPV), adenovirus (CAV) and coronavirus (CCoV) infections have been associated with significant morbidity and mortality among dogs worldwide. Clinico-pathologic and serologic studies have demonstrated the presence of these infections in the canine population of Brazil, yet incidence and prevalence data are scarce. The aim of the present study was to determine the prevalence of antibodies against these viruses in the canine population of Santa Maria, RS, Brazil. To this purpose, 817 blood samples were collected from non-vaccinated dogs of 14 neighborhoods during the 2004 and 2005 rabies vaccination campaign and tested by virus neutralization (CDV, CAV and CCoV) and by hemagglutinating inhibition (CPV). Antibodies to CDV were detected in 27.3% (223/817) of the samples, to CPV in 68.7% (561/817), to CAV in 43% (353/817) and to CCoV in 50.4% (412/817) of the dogs. An increase in seropositivity related to age was observed for CDV, CAV e CCoV. The seropositivity to CPV, CAV and CCoV was higher in males, while no differences between genders were observed to CDV. Higher prevalences to CDV and CCoV were observed among dogs having contact with other house or street dogs, while no differences in seropositivity were observed for CPV and CAV. These results indicate that CDV, CPV, CAV and CCoV infections are spread out among dogs in Santa Maria. Nonetheless, a significant part of the population is still seronegative and therefore unprotected against these viruses. This indicates a need for extending the vaccination programs to these viral infections.

Keywords: *canine distemper virus, parvovirus, adenovirus, coronavirus, dogs, epidemiology, prevalence.*

INTRODUÇÃO

O conhecimento da prevalência e da distribuição das infecções virais de animais de

companhia possui grande utilidade para indicar a necessidade de vacinação e direcionar medidas de controle (MURPHY et al., 1999). O uso sistemático de vacinas contra o vírus da cinomose (CDV), o parvovírus (CPV), o adenovírus (CAV) e o coronavírus (CCoV) tem reduzido a incidência dessas infecções e a circulação de vírus na população canina em todo o mundo. Entretanto, alguns fatores como a persistência dos vírus no ambiente e em animais portadores, o aparecimento de novas cepas e o desenvolvimento de infecção e doença mesmo em animais vacinados, têm contribuído para a manutenção do caráter enzoótico dessas viroses e a ocorrência ocasional de surtos (BÖHM et al., 2004).

O vírus da cinomose (CDV) é um vírus RNA de fita simples e polaridade negativa, com envelope, pertencente ao gênero *morbilivírus*, família *Paramyxoviridae* (MAES et al., 2003). O CDV é transmitido principalmente por aerossóis e pode ser excretado na urina por até três meses após o final da fase aguda da infecção (BLIXENKRONE-MÖLLER et al., 1993). A enfermidade caracteriza-se por febre bifásica, lesões cutâneas, sinais respiratórios e neurológicos e ocorre com maior frequência em filhotes com três a seis meses de idade. Os sinais clínicos variam de acordo com a virulência da cepa, *status* imunitário e com a idade dos cães (MAES et al., 2003). A infecção pelo CDV possui distribuição mundial e surtos têm sido relatados na Europa (BLIXENKRONE-MÖLLER et al., 1993; EK-KOMMONEN et al., 1997) e Estados Unidos (PATRONEK et al., 1995; MAES et al., 2003). No Brasil, alguns relatos clínico-patológicos e sorológicos indicam a presença da infecção na população canina. Um estudo realizado no Departamento de Patologia Veterinária da UFSM entre 1985 e 1997 revelou que entre 2136 cães necropsiados, 250 (11,7%) apresentaram corpúsculos de inclusão compatíveis com os produzidos pelo CDV no sistema nervoso central (SNC), bexiga urinária, pulmão, estômago, rins e tonsilas (HEADLEY & GRAÇA, 2000). Em Porto Alegre, RS, um estudo sorológico em 142 amostras coletadas de cães de rua detectou 30 (21,1%) positivas para a cepa *Rockborn* e sete (5,7%) positivas para a cepa *Snyder Hill* (SCHMIDT et al.,

2004). Em São Paulo, de 248 amostras de SNC de cães com sinais neurológicos, negativas para raiva, 47 (18,9%) foram positivas para antígenos do CDV por imunofluorescência (SILVA et al., 2004).

O parvovírus canino (CPV) é um vírus DNA de fita simples, sem envelope, hemaglutinante, pertencente ao gênero *parvovirus* da família *Parvoviridae*. Dois tipos de CPV já foram identificados, o CPV-1 e o CPV-2. O CPV-1 causa diarreia leve, enquanto o CPV-2 é responsável por miocardite e gastroenterite hemorrágica em filhotes entre seis semanas e seis meses de idade. O CPV-2 foi sendo substituído gradativamente na população canina por novas variantes antigênicas, ou biótipos, designados CPV2a e CPV2b (PRATELLI et al., 2001a) e um terceiro biótipo, o CPV-2c, já foi identificado (NAKAMURA et al., 2004; MARTELLA et al., 2004). A distribuição mundial da parvovirose canina deve-se em parte ao grande período de excreção viral nas fezes e à grande resistência do vírus no ambiente (BOHM et al., 2004). Desde os primeiros relatos da ocorrência da doença no Brasil (ANGELO et al., 1980; HAGIWARA et al., 1980), o CPV vem se mantendo endêmico na população canina. Em Santa Maria, 836 amostras de soro canino foram testadas por inibição da hemaglutinação (HI), detectando-se 795 (95,1%) positivas (BARCELOS et al., 1988). Um inquérito sorológico realizado em Passo Fundo, RS, com 121 amostras revelou 94% positivas para o CPV (FRANDALOSO et al., 2004). No Rio de Janeiro, 148 (46,2%) de 320 amostras fecais de cães foram positivas para o CPV-2 por PCR (MIRANDA et al., 2004).

O adenovírus canino (CAV) é um vírus DNA de fita dupla, sem envelope, pertencente ao gênero *mastadenovirus*, família *Adenoviridae*. Dois tipos de CAV já foram identificados, o CAV-1 e o CAV-2 (HU et al., 2001). O CAV-1 é o agente da hepatite infecciosa canina, uma doença de caráter superagudo, agudo ou crônico, caracterizada por febre, vômito, diarreia, dor abdominal, diátese hemorrágica, icterícia, sinais oculares e encefalopatia. A infecção geralmente é subclínica, porém o vírus pode ser excretado por mais de seis meses na urina

(CAUDELL et al., 2005). O CAV-2 é um dos agentes virais envolvidos na etiologia da traqueobronquite infecciosa. O vírus é transmitido através de aerossóis e não causa doença sistêmica (HU et al., 2001). O CAV-1 e o CAV-2 são relacionados antigenicamente e apresentam reatividade sorológica cruzada, o que possibilita o uso de cepas do CAV-2 para a produção de vacinas, já que cepas de CAV-1 podem causar lesões oculares e renais pós-vacinais (BASS et al., 1980). Acredita-se que a infecção pelo CAV possua distribuição mundial, porém são escassos os relatos de ocorrência e prevalência da infecção no Brasil e em outros países.

O coronavírus canino (CCoV) é um vírus RNA de fita simples, polaridade positiva, com envelope, pertencente ao gênero *coronavirus*, família *Coronaviridae*. O CCoV tem sido associado a surtos esporádicos de gastroenterite leve a moderada em cães de todas as idades. No entanto, os filhotes apresentam quadro clínico mais severo, cursando com anorexia, depressão, vômito e diarreia, que persistem por sete a dez dias (PRATELLI, 2002). Quando a infecção ocorre associada com a parvovirose, a gastroenterite é severa e frequentemente fatal para os filhotes (PRATELLI et al., 1999). Surtos causados pelo coronavírus, isolado ou em associação com outros agentes, têm sido relatados em vários países. Os índices de soropositividade relatados nas populações caninas são variáveis, entre 15,8% na Austrália (NAYLOR et al., 2001) e 90,8% na Itália (PRATELLI et al., 2002). No Brasil, estudos sorológicos para o CCoV são escassos, entretanto um estudo por RT-PCR detectou o RNA viral em três (20%) das 15 amostras de fezes caninas testadas (MOSCA et al., 2002).

A vacinação tem sido utilizada com relativo sucesso para o controle das principais doenças víricas de cães, incluindo as causadas pelo CDV, CPV, CAV e CCoV. No entanto, a escassez de estudos epidemiológicos e conseqüentemente de informações sobre a ocorrência dessas infecções dificulta a adoção de outras estratégias de controle. Tendo em vista a importância dessas infecções para a espécie canina, o presente estudo teve como objetivo

determinar a prevalência de anticorpos contra o CDV, CPV, CAV e CCoV, e assim estimar-se a importância sanitária desses vírus na população canina de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue de 817 cães de diferentes idades e raças, sem histórico de vacinação contra o CDV, CPV, CAV e CCoV foram coletadas em 14 bairros da cidade de Santa Maria durante a campanha de vacinação anti-rábica de 2004 e 2005, promovida pelo curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Para garantir que animais vacinados não fossem coletados, foi aplicado um questionário aos proprietários, e os cães já vacinados para os referidos vírus foram descartados. Após a retração do coágulo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 x g, o soro foi coletado, inativado por 30 minutos a 56°C e armazenado a -20°C até ser testado.

Células e vírus

Para amplificação dos vírus e realização dos testes de soroneutralização (SN), utilizaram-se células CRFK (*Crandell feline kidney*; ATCC, CCL-94) para o CPV e CCoV e células MDCK (*Madin Darby canine kidney*; ATCC, CCL-34) para o CDV e CAV. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM^a) suplementado com 10% de soro fetal bovino, acrescido de antibióticos (estreptomicina 0,4 mg/mL; penicilina 1,6mg/mL) e antifúngico (fungizona 0,0025 mg/mL). As cepas vacinais do CDV e CAV-2 foram cedidas pelo Dr. Paulo Roehle (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor; IPVDF, Eldorado do Sul, RS); a cepa 1271 do CPV-2 foi obtida no Laboratório de Virologia Molecular Animal da Universidade Federal de Viçosa, MG (LVMA/BIOAGRO/UFV). A cepa MAV #795 do CCoV foi cedida pelo Dr. Edward J. Dubovi (Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, USA).

Testes sorológicos

Os testes de SN para a detecção de anticorpos contra o CDV, CAV e CCoV foram realizados conforme a metodologia descrita por APPEL & ROBSON (1973), BÖLM et al. (2004) e PRATELLI et al. (2002), respectivamente. As amostras de soro foram diluídas (1:5 até 1:640) e incubadas com 100 a 200 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares ($DICC_{50}$) das cepas do CDV, CAV-2 ou CCoV. Amostras positivas e negativas de soro foram incluídas em cada teste. Os testes de SN foram interpretados após 96 h de incubação. Para a detecção de anticorpos contra o CPV, utilizou-se a técnica de inibição da hemaglutinação (HI), realizada de acordo com CHARMICHAEL et al. (1980). Para isso, incubaram-se diluições seriadas de soro (1:10 até 1:10240) com 8 unidades hemaglutinantes (UHA) da cepa 1271 (CPV-2), com uma suspensão de eritrócitos de suíno a 0,75%. Os títulos de anticorpos foram considerados a recíproca da maior diluição do soro capaz de prevenir a replicação viral (CDV, CAV, CCoV) ou hemaglutinação (CPV).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho representa o início de um estudo sistemático designado a obter informações epidemiológicas sobre as principais viroses de cães na cidade de Santa Maria, RS. O conhecimento da prevalência e distribuição espacial, identificação das amostras de vírus circulantes e dos fatores de risco associados às infecções podem auxiliar no planejamento de estratégias de controle, incluindo a vacinação. A necessidade ou não de vacinar-se para determinados vírus, inclusão ou exclusão de determinadas cepas nas formulações vacinais e adequação da idade mínima e dos intervalos entre vacinações, estão entre as medidas a serem eventualmente recomendadas a partir dos resultados desses estudos.

A tabela 1 apresenta os resultados dos testes sorológicos para o CDV, CPV, CAV e CCoV por bairro ou local de coleta; a tabela 2 apresenta a distribuição das amostras positivas por idade, sexo e fator de risco (contato/convivência com outros animais). A Figura 1

apresenta o resultado integrado dos testes sorológicos para os quatro agentes pesquisados. As frequências dos títulos de anticorpos para cada um dos vírus estudados estão apresentadas na Figura 2.

A amostragem apresentou uma disparidade em relação ao número de amostras coletadas por bairro (Tabela 1). Alguns bairros contribuíram com um número maior de amostras (Nova Santa Marta, n=215 e Santa Marta, n=146), enquanto um número pequeno de amostras foi coletado em outros locais. Essa disparidade numérica entre os diferentes bairros deve ser considerada na avaliação/interpretação dos resultados sorológicos. Ou seja, o percentual de soropositividade geral pode ter sido influenciado pelos índices detectados nos bairros que contribuíram com o número maior de amostras. Deve-se ressaltar também que as coletas foram realizadas preferencialmente em bairros de periferia, que possuem condições sócio-econômicas baixas. Essa medida foi adotada para se obter um número maior de amostras de cães não-vacinados, o que seria mais difícil em bairros de situação sócio-econômica melhor. Mesmo assim, o questionário aplicado revelou que uma parcela considerável dos cães desses bairros de periferia apresentava histórico de vacinação para esses vírus (dados não mostrados).

Os índices de soropositividade para os quatro agentes variaram amplamente entre os bairros. Anticorpos contra o CDV foram detectados em 27,3% das amostras (variação entre 13,6 e 37%); contra o CPV em 68,7% (45,8 a 79,2%); contra o CAV 43% (4,5 a 71%) e contra o CCoV em 50,4% (21 a 81,8%) (Tabela 1). Essas variações, ressalvadas as causadas por possíveis distorções de amostragem, podem refletir diferenças epidemiológicas entre as subpopulações estudadas.

A maioria dos cães coletados apresentou anticorpos para mais de um agente (Figura 1) e 61 (7,5%) amostras foram negativas para anticorpos contra os quatro vírus. Portanto, 756 (92,5%) cães apresentaram anticorpos contra um ou mais de um dos agentes pesquisados.

Dentre 817 amostras, 232 apresentaram anticorpos contra um dos vírus, e 527 apresentaram anticorpos para dois, três ou contra todos os vírus pesquisados.

Dentre os vírus pesquisados, o que apresentou maior soroprevalência foi o CPV (68,7%), seguido pelo CCoV (50,4%), CAV (43%) e CDV (27,3%). Esses resultados confirmam a grande disseminação e prevalência do CPV na população canina (GARCIA et al., 2002). Algumas características epidemiológicas do agente, como a grande quantidade de partículas víricas excretadas, período de excreção e, sobretudo, a grande resistência do agente no ambiente podem explicar a maior prevalência da infecção pelo CPV (BOHM et al., 2004). Anticorpos contra o CPV foram detectados em 561 amostras, dentre as quais 427 (76%) também apresentaram anticorpos contra um ou mais dos vírus para os quais foram testadas (Figura 1).

O presente estudo detectou níveis mais baixos de soropositividade ao CPV, comparando-se com estudos anteriores em Santa Maria (BARCELOS et al., 1988) e Passo Fundo (FRANDALOSO et al., 2004), que relataram aproximadamente 95% de soropositivos. Essa diferença pode ser explicada, em parte, pelo diferente *status* vacinal das populações amostradas. Ao contrário dos estudos anteriores, o presente trabalho testou somente cães sem histórico de vacinação contra esse vírus. Nos estudos anteriores, essa distinção não foi realizada no momento da coleta e provavelmente parte das amostras positivas referia-se a títulos vacinais e não resultado de infecção natural. Os estudos anteriores incluíram também coletas nas regiões centrais das cidades, onde a percentagem de cães vacinados também é provavelmente maior. Reforçando essa hipótese, a grande frequência de títulos altos detectados neste estudo (Figura 2B), ao contrário de estudos anteriores, indica que a sorologia positiva detectada resulta de infecção natural e não de vacinação, que geralmente induz títulos inferiores (PRATELLI et al., 2001a). Portanto, os resultados do presente estudo provavelmente são mais próximos da real prevalência da infecção natural pelo CPV na

população canina da cidade. É possível também que o uso contínuo da vacinação em grande parte da população canina durante décadas tenha contribuído para uma redução na circulação de vírus e conseqüentemente da incidência da infecção, conforme descrito anteriormente (McCAW et al.,1998).

A prevalência de anticorpos contra o CDV foi semelhante aos 21,1% detectados para a cepa vacinal *Rockborn* em Porto Alegre (SCHMIDT et al., 2004). Esses autores relataram variações na prevalência quando as amostras foram testadas com diferentes cepas vacinais e isolados brasileiros do CDV, demonstrando a existência de diferenças antigênicas importantes entre as cepas de referência e isolados locais. Essas diferenças podem ter implicações para o diagnóstico e também para a eficácia das vacinas. A prevalência da infecção pelo CDV confirma a presença do agente em nosso meio, fato já documentado pela casuística de cinomose relatada por clínicos locais, e também pelos resultados de pesquisa realizada em cães necropsiados no Departamento de Patologia Veterinária da UFSM (HEADLEY & GRAÇA, 2000).

Embora relatos clínico-patológicos com ou sem confirmação virológica e/ou sorológica indiquem que a infecção pelo CAV está amplamente distribuída na população canina, dados sorológicos sobre prevalência e distribuição são escassos no Brasil. Um estudo realizado com 4.660 cães necropsiados entre 1970 e 2000 no Departamento de Patologia Veterinária da UFSM relatou 42 casos de hepatite infecciosa canina (ROZZA, 2003). Os resultados do presente estudo corroboram as observações clínico-patológicas em cães da população estudada e indicam que a infecção pelo CAV está presente e provavelmente tem afetado uma parcela significativa de animais. No entanto, a ausência de histórico mais freqüente de doença indica que grande parte das infecções é subclínica, situação já bem documentada (BÖHM et al., 2004). A infecção pelo CAV-2, que causa traqueobronquite infecciosa, também é freqüente. Além de indicar que a infecção está amplamente difundida na

população canina, os resultados obtidos demonstram que grande parte da população está desprotegida (soronegativa), o que favorece a contínua circulação do vírus e a ocorrência de doença. Dentre 353 amostras positivas para anticorpos contra o CAV, 87% (308) também foram positivas para um ou mais dos outros três vírus pesquisados (Figura 1). A vacinação maciça, com vacinas contendo o CAV-2 poderia reduzir a parcela susceptível da população e assim desfavorecer a circulação do vírus (BÖHM et al., 2004).

Embora o CCoV seja responsável por infecção assintomática ou gastroenterite leve a moderada, esse vírus é considerado um importante patógeno canino e causa mortalidade quando a infecção ocorre associada a outros agentes virais (PRATELLI et al., 1999; PRATELLI et al., 2001b; DECARO et al., 2004). Embora com menor prevalência que o CPV, foi demonstrado que a infecção pelo CCoV é freqüente entre os cães da cidade. Nesse sentido, observou-se que 35,5% (290) dos cães apresentavam anticorpos contra o CPV e o CCoV. Em áreas onde o CCoV é enzoótico e a vacinação contra o agente não é uma prática freqüente, a co-infecção com outros agentes como o CDV, CPV ou CAV-1, pode levar a altos índices de mortalidade em canis e abrigos de animais. Dentre as amostras positivas para anticorpos contra o CCoV, 89% (368/412) também apresentaram anticorpos contra pelo menos um dos vírus pesquisados (Figura 1). Dados de prevalência do CCoV no Brasil são escassos, não existindo também estudos anteriores de prevalência de anticorpos para o vírus em Santa Maria.

Na tentativa de se identificar possíveis fatores de risco associados com as infecções estudadas, aplicou-se um questionário com as informações relativas à idade, sexo e grau de convivência com outros cães. O índice inferior de soropositividade nos cães jovens provavelmente reflete uma menor exposição ao agente, comparando-se com animais mais idosos (Tabela 2). A soropositividade aumentou com a idade para o CDV (entre 14,3 e 38,6%), excluindo-se os cães entre dois e três anos que apresentaram 21% de prevalência

(Tabela 2). Os índices de positividade para o CPV mantiveram-se em níveis pouco variáveis nas diferentes faixas etárias (entre 63,6 e 72%). Em geral, a soropositividade para o CAV apresentou um aumento gradativo com a idade (30,2% entre cães com idade inferior a um ano a 58,7% entre animais com mais de cinco anos), provavelmente refletindo uma exposição maior ao agente (Tabela 2). Com relação à idade, cães com idade inferior a um ano apresentaram uma soropositividade menor (45%) para o CCoV e pequenas variações na soroprevalência também foram observadas de acordo com a idade (Tabela 2).

Os machos apresentaram prevalência de anticorpos superior à das fêmeas contra o CPV, CAV e CCoV. O sexo é considerado um fator de risco devido ao comportamento diferente observado entre machos e fêmeas. As fêmeas geralmente têm menor contato com outros cães, contato esse que é restrito aos cães de convívio na residência e filhotes, enquanto que os machos tendem a ter maior contato com outros cães fora da residência. Para o CDV, os índices de soropositividade foram semelhantes entre os sexos, corroborando outros estudos que observaram que não há alterações significativas na prevalência do CDV entre machos e fêmeas (PATRONEK et al., 1995; HEADLEY & GRAÇA, 2000) (Tabela 2).

Para o CPV e CAV, não se observou diferenças entre os cães que têm contato ou convívio com outros cães em relação aos animais que não têm contato. Para o CDV e CCoV, os cães que têm contato ou convívio com outros cães apresentaram uma soroprevalência relativamente maior (Tabela 2). Esses dados devem ser interpretados com cautela, pois é possível que parte das informações fornecidas em relação a esse fator de risco não reflita fielmente a realidade, não permitindo uma interpretação correta e extrapolação dos resultados. No caso dessa diferença ser real, algumas características epidemiológicas de cada infecção podem explicá-la parcialmente. Os altos títulos virais excretados, o longo período de eliminação e a grande resistência dos agentes no ambiente fazem com que o contato direto não seja o único meio de transmissão e disseminação do CPV e CAV. Por isso, a infecção se

disseminaria independentemente de convívio mais estreito entre animais, o que explicaria os valores semelhantes de soropositividade entre os dois grupos de cães (com e sem convívio). Por outro lado, a excreção viral em títulos mais baixos, a necessidade de contato direto para transmissão, assim como a menor resistência dos agentes no ambiente, explicariam a diferença de soroprevalência para o CDV e CCoV entre os grupos, sendo que os expostos/com convívio apresentaram índices maiores.

A frequência dos títulos de anticorpos também apresentou padrões de distribuição diferentes entre os vírus. No caso do CPV, pode-se observar uma concentração considerável de animais com títulos altos, o que é característico de exposição natural ao agente (PRATELLI et al., 2001a). Títulos moderados e baixos foram observados com menor frequência. A distribuição dos títulos para o CDV e CAV foi irregular, não apresentando uma tendência clara de aumento ou redução da frequência de acordo com a magnitude da resposta sorológica. A distribuição irregular dos títulos de anticorpos entre os cães para o CAV deve-se, em parte, à reatividade sorológica cruzada existente entre CAV-1 e CAV-2 e, portanto à detecção de anticorpos produzidos contra os dois agentes utilizando-se uma cepa de CAV-2 nos testes sorológicos (Figura 2C). No caso do CDV, a variabilidade individual da resposta imunológica à infecção e também a existência de diferentes sorotipos circulando na população podem explicar a distribuição irregular dos títulos (Figura 2A). A grande concentração de amostras com títulos baixos (5, 10) contra o CCoV provavelmente deve-se às características da resposta imunológica contra o agente. A infecção pelo CCoV geralmente induz títulos baixos e de pouca duração, pois raramente ocorre disseminação sistêmica do agente (EUGSTER, 1992). Títulos moderados a altos foram detectados em frequências progressivamente menores (Figura 2D).

Em resumo, os resultados apresentados nesse estudo demonstram que o CDV, CPV, CAV e CCoV estão circulando ativamente na população canina dos bairros de Santa Maria.

Os índices de prevalência indicam, no entanto, que grande parte da população ainda é soronegativa e, portanto susceptível a esses vírus. Esse alto percentual de animais susceptíveis, associado à alta frequência das infecções, ao período em que cães permanecem excretando o vírus, com a persistência ambiental desses agentes, fornecem condições ideais para a contínua circulação dos vírus e para a perpetuação enzoótica dessas viroses na população (BOHM et al., 2004). Nesse sentido, somente um programa contínuo de vacinação maciça de cães jovens poderia produzir um aumento da imunidade da população, resultando na redução da circulação de vírus e conseqüentemente na redução da ocorrência da enfermidade.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aCutilab LTDA, Campinas, SP, Brasil.

REFERÊNCIAS

ANGELO, M.J.O. et al. Isolamento de parvovírus canino no Brasil. **Revista da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.25, p.123-134, 1980.

APPEL, M.J.G.; ROBSON, D.S. A microneutralization test for canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p.1459-1463, 1973.

BARCELOS, V.H.L. et al. Prevalência de anticorpos inibidores da hemaglutinação frente ao parvovírus canino em Santa Maria, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, n.10, v.6, p. 99-102, 1988.

BASS, E.P. et al. Evaluation of a canine adenovirus type 2 strain as a replacement for infectious canine hepatitis vaccine. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.177, p.234-242, 1980

BLIXENKRONE-MÖLLER, M. et al. Studies on manifestations of canine distemper virus

infection in a urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.163-173, 1993.

BÖHM, M. et al. Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. **Veterinary Record**, v.154, p.457-463, 2004.

CARMICHAEL, L.E. et al. Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.784-791, 1980.

CAUDELL, D. et al. Diagnosis of infectious canine hepatitis virus (CAV-1) infection in puppies with encephalopathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.58-61, 2005.

DECARO et al. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. **New Microbiology**, v.27, n.2, p.177-181, 2004.

EK-KOMMONEN, C. et al. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **Veterinary Record**, v.141, p.380-383, 1997.

EUGSTER, A.K. Coronavirus In : CASTRO, A.E., HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology**. 1^a ed. St Louis: Mosby Year Book, 1992. p. 138-141.

FRANDALOSO, R. et al. Avaliação soroepidemiológica da parvovirose canina na região de Passo Fundo. In : MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14. 2004, Passo Fundo. Resumos... Passo Fundo : Universidade de Passo Fundo, 2004.

GARCIA, R.C.N.C. et al. Infecção pelo parvovírus canino no Rio de Janeiro: um estudo de cinco anos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, n.1, p.42-46, 2002.

HAGIWARA, M.K. et al. Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.47, n.1/2, p.47-49, 1980.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.2, 2000.

HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain

reaction. **Veterinary Research Communications**, v.25, p.77-84, 2001.

MAES, R.K. et al. A canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, n.3, p.213-220, 2003.

MARTELLA, V. et al. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3, p.1333-1336, 2004.

McCAW, D.L. et al. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.213, n.1, p.72-75, 1998.

MIRANDA, S.C. et al. Diagnosis of canine parvovirus infection in the state of Rio de Janeiro from 1995 to 2003 In : ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 15. 2004, São Pedro. Resumos... São Paulo : Sociedade Brasileira de Virologia, 2004, v.9, p.187.

MOSCA, X. et al. Canine coronavirus detection in feces by RT-PCR. In : ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 13. 2002, Águas de Lindóia. Resumos... São Paulo : Sociedade Brasileira de Virologia, 2002, v.7., n.1, p.81.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3 ed. Califórnia : Academic Press, 1999, 629p.

NAKAMURA, M. et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a vietnamese dog. **Archives of Virology**, v.149, p. 2261-2269, 2004.

NAYLOR, M.J. et al. Canine coronavirus in australian dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.79, p.116-119, 2001.

PATRONEK, G.J. et al. Canine distemper infection in pet dogs: a case control study of risk factors during a suspected outbreak in Indiana. **Journal of American Hospital Association**, v.31, p.230-235, 1995.

PRATELLI, A et al. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.550-553, 1999.

PRATELLI, A. et al. Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, n.8, v.3, p.612-615, 2001a.

PRATELLI, A. et al. Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.385-392, 2001b.

PRATELLI, A. et al. Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbant assay in dogs in the south of Italy. **Journal of Virological Methods**, v.102, p.67-71, 2002.

ROZZA, D.B. **Lesões hepáticas em cães necropsiados**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

SILVA, L.H.Q. et al. Diagnóstico diferencial entre a raiva e a cinomose canina em amostras de cérebro de cães examinadas no período de 1998 a 2001 na região de Araçatuba, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v.71, n.3, p.317-321, 2004.

SCHMIDT T. L. et al. Neutralising antibody to vaccine strains and Brazilian isolates of canine distemper virus In : ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 15. 2004, São Pedro. Resumos... São Paulo : Sociedade Brasileira de Virologia, 2004, v.9, p.75.

Tabela 1. Anticorpos contra o vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV) em cães não-vacinados de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, de acordo com o bairro ou local de coleta.

Local de coleta/bairro	Número de amostras	Positivas			
		CDV	CPV	CAV	CCoV
Camobi	88	18 (20,4)	60 (68,2)	45 (51,1)	31 (35,2)
Trevo da Uglione	22	6 (27,3)	11 (50)	1 (4,5)	9 (41)
Cohab Tancredo Neves	50	16 (32)	34 (68)	26 (52)	18 (36)
Boi Morto	37	10 (27)	21 (56,8)	16 (43)	12 (32,4)
Regimento Mallet	48	11 (22,9)	35 (72,9)	16 (33,3)	20 (41,6)
Hipódromo	24	8 (33,3)	11 (45,8)	9 (37,5)	9 (37,5)
Cohab Santa Marta	146	54 (37)	88 (60,3)	71 (48,6)	90 (61,6)
Nova Santa Marta	215	56 (26)	171 (79,5)	78 (36,3)	122 (56,7)
Nonoai	19	7 (36,8)	13 (68,4)	7 (36,8)	4 (21)
Itararé	30	9 (30)	18 (60)	10 (33,3)	14 (46,7)
Cerro Azul	22	3 (13,6)	17 (77,3)	8 (36,4)	18 (81,8)
Vila Carolina	42	13 (30,9)	25 (59,5)	30 (71)	25 (59,5)
Vila Kennedy	21	3 (14,3)	15 (71,4)	13 (61,9)	5 (23,8)
Menino Deus	53	9 (17)	42 (79,2)	23 (43,4)	35 (66)
TOTAL	817	223 (27,3)	561 (68,7)	353 (43)	412 (50,4)

Tabela 2. Anticorpos contra o vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV) em cães não-vacinados de Santa Maria, RS, Brasil, por atributo e fator de risco^a.

Vírus	Idade (anos) ^b						Sexo		Convívio com outros cães ^c	
	<1	1 – 2	2 – 3	3 – 5	>5	NI	Macho	Fêmea	Sim	Não
	n=182	n=150	n=110	n=129	n=184	n=63	n=493	n=324	n=670	n=147
CDV	14,3	27,3	21	28	38,6	41,3	27,6	26,8	28,4	21,8
CPV	69,2	72	70,9	67,4	63,6	71,4	70,4	64,8	68,9	67,3
CAV	30,2	34	38,2	52,7	58,7	39,7	48,3	34,3	43	41,5
CCoV	45	41,3	50	55,8	57	57	52,7	46,9	51,3	44,9

^a Percentagem de animais positivos.

^b Faixas etárias: menos de 1 ano, 1 a 2 anos, 2 a 3 anos, 3 a 5 anos, mais de 5 anos. NI: não informado

^c Convívio com outros cães na residência, na rua ou ambos (sim ou não).

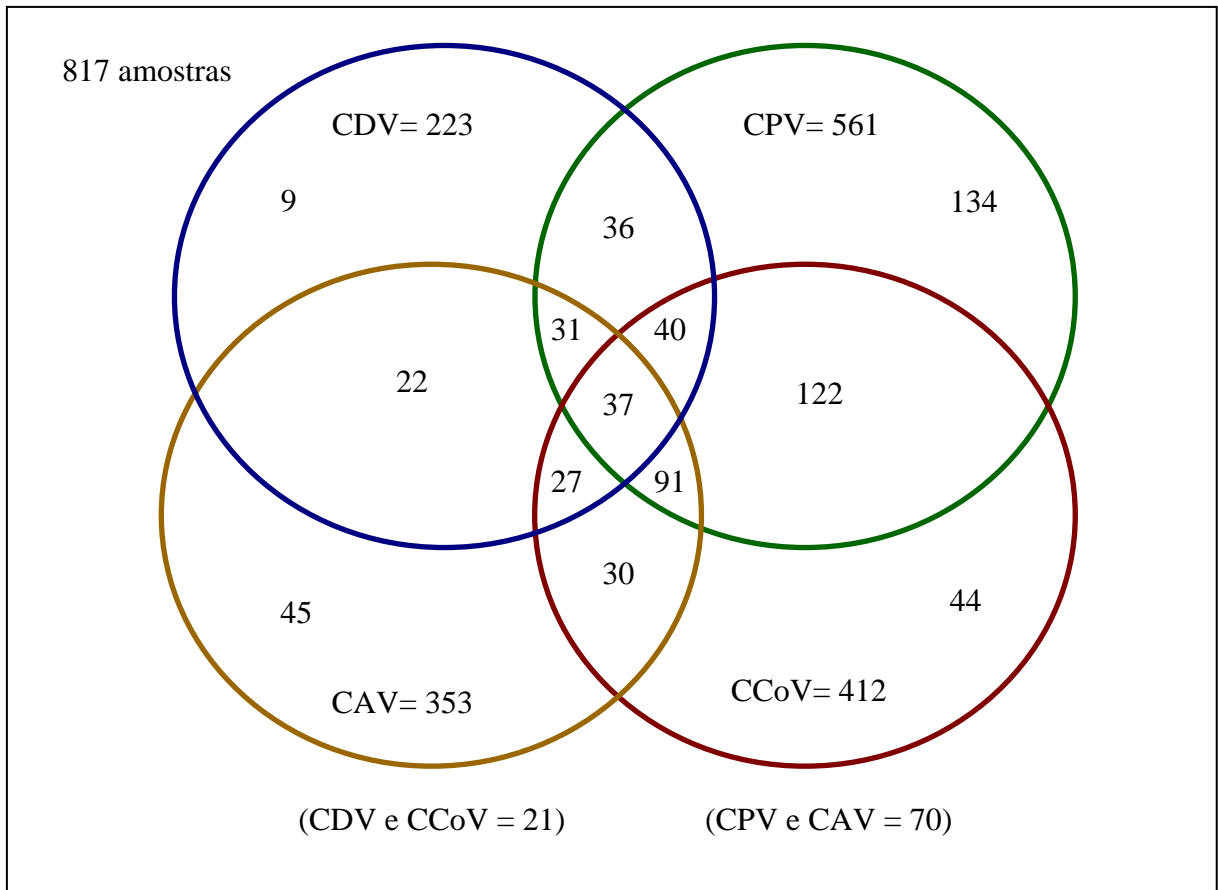


Figura 1. Amostras positivas para anticorpos contra os vírus da cinomose, parvovírus canino, adenovírus canino e coronavírus canino, individuais e para mais de um vírus.

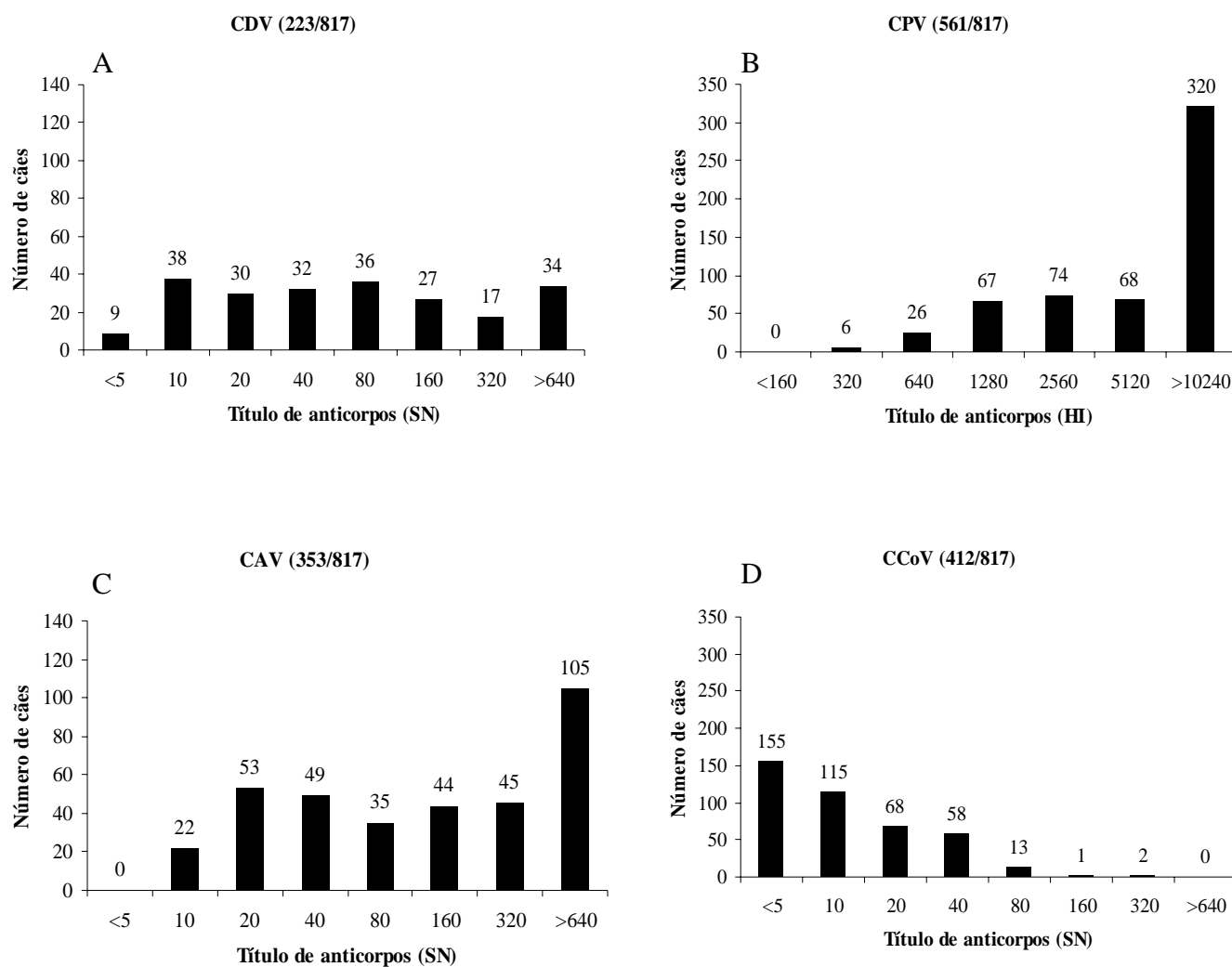


Figura 2. Frequência dos títulos de anticorpos contra o vírus da cinomose (CDV; A), parvovírus canino (CPV; B), adenovírus canino (CAV; C) e coronavírus canino (CCoV; D) em cães não-vacinados de Santa Maria, RS, Brasil. SN – soroneutralização, HI – inibição da hemaglutinação.

3. CAPÍTULO 2

Seleção e caracterização de linhagens celulares de origem canina, suína e leporina resistentes ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV).

Selection and characterization of canine, swine and leporine cell lines resistant to bovine viral diarrhea virus (BVDV).

Renata Dezengrini¹, Rudi Weiblen² e Eduardo Furtado Flores^{2*}

(artigo submetido ao Journal of Virological Methods, 2006)

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva. Setor de Virologia. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. Fone/fax: 55-3220-8834. *Autor para correspondência: e-mail: flores@ccr.ufsm.br.

RESUMO

A contaminação inadvertida de cultivos celulares com vírus adventícios pode representar um sério problema para o diagnóstico virológico, pesquisa e produção de imunobiológicos. O presente artigo relata a produção e caracterização de três linhagens celulares resistentes ao vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), o principal vírus contaminante de cultivos celulares. As linhagens resistentes foram obtidas a partir das células parentais (MDCK, Madin Darby canine kidney; PK-15, porcine kidney e RK-13, rabbit kidney) que estavam contaminadas com o BVDV. Essas células foram submetidas a quatro ciclos de infecção com uma cepa citolítica de BVDV. As células que sobreviveram à infecção lítica foram clonadas, expandidas e testadas para a sua susceptibilidade ao BVDV e a outros vírus de interesse. A resistência ao BVDV foi investigada pela pesquisa de antígenos virais por imunofluorescência indireta e por co-cultivo com células susceptíveis após a inoculação do vírus em altos títulos. As três linhagens celulares demonstraram ser resistentes a três cepas-padrão (Singer, NADL e Oregon) e a 10 isolados de campo do BVDV. A inoculação do BVDV com uma multiplicidade de infecção de 10 DICC₅₀/célula resultou em frequências de infecção de $<10^{-5}$ para as células MDCK-R e PK-15R; e de $3,3 \times 10^{-4}$ para as células RK-13R. Comparando-se com as células parentais, verificou-se que as linhagens resistentes são >10.000 (MDCK-R), >20.000 (PK-15R) e 600 (RK-13R) vezes menos susceptíveis ao BVDV. A inoculação do vírus nas células resistentes na presença de polietilenoglicol (PEG) resultou em um aumento na susceptibilidade das células na ordem de >437 (MDCK-R), >346 (PK-15R) e 87 vezes (RK-13R). Esses resultados indicam que a resistência dessas linhagens ao BVDV reside em um bloqueio na penetração do vírus, que pode ser parcialmente revertido pela adição do PEG. Por outro lado, cada linhagem resistente conservou a susceptibilidade a outros três vírus que replicam nas células parentais. Essas características tornam essas linhagens celulares úteis para o diagnóstico,

multiplicação de vírus e produção de vacinas, sem o risco de contaminação acidental com o BVDV.

Palavras-chave: *vírus da Diarréia Viral Bovina, BVDV, contaminação celular, pestivírus, células resistentes.*

ABSTRACT

The inadverted contamination of cultured cells with adventitious viruses may represent a serious problem for diagnostic virology, research and production of biologicals. This article reports the production and characterization of three cell lines resistant to bovine viral diarrhea virus (BVDV), the main viral contaminant of cultured cells. The resistant cells were obtained out of each parental cell line (MDCK, Madin Darby canine kidney; PK-15, porcine kidney and RK-13, rabbit kidney) that were already contaminated with BVDV. Initially, the cells were submitted to four rounds of infection with a highly cytolytic BVDV strain. The cells surviving the infection were then cloned out, expanded, and assayed for their susceptibility to BVDV. The resistance was investigated by searching for viral antigens by immunofluorescence and by cocultivation with susceptible cells following inoculation of BVDV at high titers. All three cell lines were resistant to three standard BVDV strains (Singer, NADL e Oregon) and to 10 field isolates. Inoculation of BVDV at a multiplicity of infection of 10 TCID₅₀/cell resulted in frequencies of infection of $<10^{-5}$ for MDCK-R and PK-15R cells and of $3,3 \times 10^{-4}$ for RK-13R cells. Compared to the parental ones, the resistant cells were >10.000 (MDCK-R), >20.000 (PK-15R) and 600 (RK-13R) times less susceptible to BVDV. Inoculation of BVDV in the resistant cells in the presence of polyethylene-glycol (PEG) resulted in an increase in susceptibility in the order of >437 (MDCK-R), >346 (PK-15R) e 87 (RK-13R) times. These results indicate that resistance of these cell lines is probably due to a block in viral entry which can be partially overcome by addition of PEG. On the

other hand, each resistant cell line retained the susceptibility to three other viruses which replicate in the parental cells. Thus, these cells may be useful for virology diagnostic, virus propagation and for vaccine production, without the risk of being inadvertently contaminated with BVDV.

Keywords: bovine viral diarrhea virus, BVDV, cell contamination, pestivirus, resistant cells.

INTRODUÇÃO

A contaminação de cultivos celulares com vírus adventícios se constitui em um grande problema para laboratórios que utilizam células de cultivo para diagnóstico, pesquisa e produção de imunobiológicos (FROMMER et al., 1993). Embora contaminações com vários vírus já tenham sido relatadas, o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) é considerado o principal contaminante de cultivos celulares (NUTTALL et al., 1977; LEVINGS & WESSMAN, 1991; BOLIN et al., 1994). A origem mais comum da contaminação pelo BVDV é o soro fetal bovino (SFB), utilizado como promotor de crescimento celular (LEVINGS & WESSMAN, 1991).

O BVDV é um vírus RNA de fita simples, polaridade positiva, com envelope, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *pestivirus* e está amplamente distribuído na população bovina (BAKER, 1995). Fetos bovinos infectados pelo BVDV entre os dias 40 e 120 de gestação freqüentemente tornam-se persistentemente infectados e contém altos títulos do vírus no sangue (BAKER, 1995). Como consequência, o soro coletado desses fetos contém o BVDV e se este soro for utilizado em cultivos resultará na sua contaminação (NUTTALL et al., 1977; LEVINGS & WESSMAN, 1991). A problemática de contaminação de cultivos celulares pelo BVDV reveste-se de especial relevância pelos seguintes aspectos: i. O SFB é o principal promotor de crescimento de células de cultivo, e até o presente não existem substitutivos à altura (WESSMAN & LEVINGS, 1999); ii. O BVDV é capaz de replicar em

células de várias espécies *in vitro*, incluindo células de origem humana (NUTTALL et al., 1977; BOLIN et al., 1994); e iii. Os isolados de BVDV que produzem infecção fetal persistente e mais frequentemente estão presentes no SFB não produzem citopatologia detectável nos cultivos (BOLIN et al., 1994). Por isso, as contaminações celulares pelo BVDV e outros pestivírus são de difícil detecção, podendo passar indefinidamente despercebidas (NUTTALL et al., 1977; LEVINGS & WESSMANN, 1991).

A contaminação inadvertida de cultivos celulares com o BVDV pode interferir em resultados de diagnóstico e pesquisa, além de resultar em contaminação de estoques de outros vírus amplificados nesses cultivos (BOLIN et al., 1991). De especial interesse tem sido a contaminação acidental de vacinas de uso humano e animal. Conseqüências sérias à saúde animal decorrentes dessa contaminação já foram relatadas (VANNIER et al., 1988; WENSVOORT & TERPSTRA, 1988; KREEFT et al., 1990; LEVINGS & WESSMAN, 1991; AUDET et al., 2000; FALCONE et al., 2000; BARKEMA et al., 2001). Na Itália foi relatado um surto que acometeu 70% dos bovinos que receberam uma vacina diferencial de herpesvírus bovino (BHV-1) contaminada com o BVDV. Esses bovinos apresentaram sinais respiratórios, gastrointestinais, diminuição na produção de leite e emagrecimento (BARKEMA et al., 2001). Suínos imunizados com uma vacina para o vírus da Peste Suína Clássica (CSFV) contaminada com o BVDV apresentaram sinais clínicos indistinguíveis de Peste Suína Clássica (WENSVOORT & TERPSTRA, 1988). Por essas razões, o risco de contaminação de cultivos celulares pelo BVDV e outros pestivírus tem merecido especial atenção, exigindo cuidados e monitoramento contínuos (BOLIN et al., 1991; FROMMER et al., 1993; HARASAWA & MIZUSAWA, 1995; AUDET et al., 2000).

Controle da origem do soro, inativação de possíveis contaminantes por métodos físicos, pesquisa de vírus e/ou produtos virais no SFB, tratamento do soro e células com drogas antivirais, além de monitoramento dos cultivos por técnicas moleculares e

imunológicas têm sido utilizadas para minimizar o risco dessas contaminações (BOLIN et al., 1991; GIVENS et al., 2004). O processo de filtração utilizado na preparação comercial do SFB remove a maioria dos agentes infecciosos presentes, no entanto o BVDV parece ultrapassar esses filtros, graças ao pleomorfismo e o pequeno tamanho das partículas víricas (ZABAL et al., 2000). A irradiação gama é um método efetivo para eliminar a contaminação pelo BVDV no SFB (STUDER et al., 2002). Não obstante esses métodos, contaminações acidentais pelo BVDV continuam a ocorrer e grande parte das células depositadas nos bancos comerciais de linhagens celulares encontra-se contaminada (NUTTALL et al., 1977; BOLIN et al., 1994; HARASAWA & MIZUSAWA, 1995).

A seleção de linhagens celulares resistentes aos pestivírus, porém susceptíveis a outros vírus de interesse, surgiu como uma alternativa para a problemática dessas contaminações. Uma linhagem celular resistente ao CSFV foi obtida a partir de clonagem de células da linhagem IB-RS-2 (Instituto Biológico – rim suíno – clone 2), inicialmente contaminadas com esse vírus. Essas células são tradicionalmente utilizadas para multiplicar o vírus da Febre Aftosa e alguns vírus de suínos (HOUSE et al., 1988). Posteriormente, foi relatada a seleção de uma linhagem de células de rim bovino resistentes ao BVDV, denominada de CRIB (*cells resistant to infection with BVDV*). As células CRIB foram obtidas a partir da linhagem MDBK (*Madin Darby bovine kidney*); são resistentes ao BVDV e a outros pestivírus e conservam a susceptibilidade a outros vírus de ruminantes (FLORES & DONIS, 1995). A linhagem CRIB foi disponibilizada e tem sido utilizada por vários laboratórios no Brasil e no exterior, no diagnóstico virológico, na pesquisa, para multiplicação de outros vírus e inclusive para a produção de vacinas (FLORES, E.F. comunicação pessoal).

O presente trabalho relata a seleção e caracterização de linhagens de células MDCK (*Madin Darby canine kidney*), PK-15 (*porcine kidney*) e RK-13 (*rabbit kidney*) resistentes ao BVDV. As linhagens parentais têm sido amplamente utilizadas em virologia animal e a sua

contaminação com o BVDV tem sido relatada reiteradas vezes (NUTTALL et al., 1977; BOLIN et al., 1994; FLORES, E.F. comunicação pessoal).

MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia utilizada para a seleção das linhagens resistentes ao BVDV a partir das células MDCK, PK-15 e RK-13 foi semelhante à descrita para a linhagem CRIB, obtida a partir das células MDBK (FLORES & DONIS, 1995). Células da linhagem CRFK (*Crandel feline kidney*) também foram submetidas a este procedimento. Em resumo, as linhagens resistentes foram obtidas pela expansão e clonagem de células que resistiram a quatro ciclos de infecção com uma cepa citolítica de BVDV. As populações resultantes foram então testadas em relação a: i. presença de vírus e produtos virais residuais; ii. resistência a três cepas padrão e a 10 isolados de campo do BVDV iii. mecanismo de resistência e iv. susceptibilidade a outros vírus de interesse.

Células e vírus

Foram utilizadas as linhagens celulares MDCK (ATCC, CCL-34), PK-15 (ATCC, CCL-33), RK-13 (ATCC, CCL-37) e CRFK (ATCC, CCL-94). Células MDBK (ATCC, CCL-22) e CRIB (FLORES & DONIS, 1995) foram utilizadas como controle nos diversos procedimentos. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM; Cultilab^a) suplementado com soro equino (10%), estreptomicina (0,4mg/mL), penicilina (1,6mg/mL), nistatina (0,002mg/mL) e fungizona (0,0025mg/mL). As cepas padrão de BVDV utilizadas foram: Singer, NADL e Oregon, cedidas pelo Dr. Ruben Donis (Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE, EUA). Os isolados de BVDV utilizados nos testes de susceptibilidade foram: UFSM-2, SV-11, SV-357 e SV-323 (isolados brasileiros de BVDV; FLORES et al., 2005); 35, 50, 54, 73, VS 78 e BVDV ovino (isolados norte-americanos de BVDV; Dr. Fernando Osorio, Veterinary Diagnostic Center, University

of Nebraska, Lincoln, NE, USA).

Para os testes de susceptibilidade das células MDCK utilizaram-se o adenovírus canino tipo 2 (CAV-2), o vírus da cinomose (CDV; cedidos pelo Dr. Paulo Roehe, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, Eldorado do Sul, RS) e o parvovírus canino tipo 2 (CPV-2; cedido pelo Dr. Mauro Pires Moraes, Laboratório de Virologia Molecular Animal da Universidade Federal de Viçosa, LVMA/BIOAGRO/UFV, Viçosa, MG); para as células PK-15 utilizaram-se o vírus da doença de Aujeszky (PRV), o enterovírus suíno tipo 3 (PEV-3; Setor de Virologia, SV/UFSM, Santa Maria, RS) e o parvovírus suíno (PPV; fornecido pelo Dr. Luizinho Caron, Instituto Riograndense de Febre Aftosa, IRFA, Porto Alegre, RS). A susceptibilidade das células RK-13 foi testada para o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1; cedido pela Dra. Clarice Arns, Departamento de Genética, Unicamp, Campinas, SP), um isolado de herpesvírus de coelhos (RHV; SV/UFSM) e o vírus da arterite viral equina (EVAV; National Veterinary Laboratory Service, NVSL/USDA/USA).

Seleção das linhagens resistentes

As células de cada linhagem foram inicialmente infectadas com a cepa Singer a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 10 (10 doses infectantes para 50% dos cultivos [DICC₅₀] por célula). Os cultivos infectados foram mantidos por aproximadamente 72 horas para permitir a infecção e a destruição do maior número possível de células. As células sobreviventes foram então cultivadas até atingirem a confluência. Esse procedimento foi repetido três outras vezes, num total de quatro ciclos de infecção lítica. As células que restaram após a quarta inoculação foram expandidas e clonadas por diluição limitante. Clones derivados de uma única célula foram identificados e expandidos. Para a caracterização descrita a seguir, utilizou-se um clone de cada linhagem. Os respectivos clones foram designados MDCK-R e PK-15 R e RK-13R, para diferenciá-los das linhagens parentais.

Pesquisa de vírus e produtos virais

As células resultantes da clonagem e expansão foram submetidas à pesquisa de vírus residual e produtos virais. Para isso, células fixadas em acetona foram submetidas à imunofluorescência indireta (IFI) para antígenos do BVDV, utilizando-se uma mistura de anticorpos monoclonais (AcMs) como anticorpo primário (KREUTZ et al., 2000) e um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (Sigma^b) como anticorpo secundário (FLORES & DONIS, 1995). Posteriormente, essas células foram co-cultivadas (1:1) com células MDBK durante quatro dias, seguido de IFI, conforme descrito acima.

Investigação da susceptibilidade ao BVDV

Os clones obtidos de cada linhagem foram inicialmente testados em relação à sua susceptibilidade a cepa padrão de BVDV Singer. Para isso, células cultivadas em placas de seis cavidades foram inoculadas com uma m.o.i. de 10 e submetidas a IFI 24 horas após. Células MDBK, CRIB e as linhagens parentais foram utilizadas como controles. Após a demonstração que as linhagens eram resistentes à cepa Singer, o procedimento foi repetido com as cepas padrão NADL e Oregon e com 10 isolados de campo do BVDV, citopáticos e não citopáticos e de ambos os genótipos (BVDV-1 e BVDV-2).

Um método adicional foi utilizado para verificar se as linhagens resistentes eram capazes de manter níveis baixos de replicação do BVDV. Após inoculação com a cepa Singer (m.o.i. de 10), adsorção por 2 horas, remoção do inóculo e adição de soro hiperimune contra a cepa Singer (produzido em bovino, com título neutralizante de 1028) diluído 1:20 em MEM por 24 horas, as células foram tripsinizadas e co-cultivadas (1:1) com células MDBK por quatro dias. Ao final, os co-cultivos foram submetidos à IFI. Células MDBK, CRIB e as linhagens parentais foram utilizadas como controles.

Quantificação da susceptibilidade ao BVDV

A susceptibilidade das células parentais e resistentes ao BVDV foi estimada da seguinte forma: os cultivos foram inoculados com a cepa Singer (m.o.i. de 10) e após 24h

foram submetidos à IFI. As lâminas foram examinadas em microscópio de luz ultravioleta e as células positivas para antígenos virais foram quantificadas. Para cada linhagem (parental e resistente) foram examinados seis orifícios da lâmina, abrangendo aproximadamente 10^5 células. O percentual de células positivas foi estimado relacionando-se o número de células positivas com o total de células examinadas.

Infecção mediada por polietilenoglicol (PEG)

Células parentais e resistentes de cada linhagem foram inoculadas com a cepa Singer (m.o.i. de 1) na ausência ou presença de PEG a 10% em MEM (polietilenoglicol, peso molecular 6000^o). Após duas horas de adsorção, as células foram tripsinizadas e transferidas para lâminas de microscopia de teflon (*multispot*). Após 24 horas, os cultivos foram submetidos à IFI e as células positivas para antígenos virais presentes em seis orifícios (10^5 células) foram quantificadas.

Susceptibilidade a outros vírus de interesse

A susceptibilidade das linhagens celulares parentais e resistentes a outros vírus de interesse foi comparada. Para tal, as três linhagens celulares (parentais e resistentes) foram inoculadas com cada um dos três vírus com uma m.o.i. aproximada de 1. Após duas horas de adsorção, o inóculo foi removido, os tapetes celulares foram lavados com MEM seguido de reposição de meio de cultivo. O sobrenadante dos cultivos foi coletado 24 horas após e a infectividade foi quantificada pelo método de diluição limitante. Os títulos virais foram calculados de acordo com REED & MUENCH (1938) e expressos como $\log \text{DICC}_{50}/\text{mL}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das células resistentes

Durante o monitoramento de rotina das células de cultivo utilizadas no Setor de Virologia (SV/UFSM), a realização de IFI revelou que as linhagens MDCK, PK-15 e RK-13

estavam contaminadas com amostras não-citopáticas (ncp) do BVDV. O percentual de células inicialmente contaminadas era de aproximadamente 15% para as células MDCK e PK-15, e 5% para as células RK-13. Tentou-se, sem sucesso, obter clones livres de contaminação pela clonagem das células por diluição limitante.

Optou-se então por tentar o mesmo procedimento utilizado para a seleção das células CRIB a partir das células MDBK (FLORES & DONIS, 1995). As células de cada linhagem foram submetidas a quatro ciclos de infecção lítica com a cepa citopática Singer. Após a primeira inoculação, a percentagem de células positivas para antígenos virais era de aproximadamente 13% (MDCK), 20% (PK-15) e 5% (RK-13) (Tabela 1). O número de células infectadas a cada ciclo, monitorado por IFI, foi variável entre as linhagens e reduzia-se a cada nova infecção (dados não apresentados). Ao final do quarto ciclo, as células que sobreviveram foram então expandidas e posteriormente clonadas por diluição limitante. Após aproximadamente 30 a 40 dias de expansão e clonagem, foram selecionados 21 clones de células MDCK, 21 das células PK-15 e 13 das células RK-13. Como esses clones eram derivados de cultivos que haviam sido inoculados com o BVDV, as células foram submetidas à IFI para pesquisa de antígenos virais e após o co-cultivo com células MDBK para pesquisa de vírus residual. Todos os clones testados foram negativos para o BVDV.

No presente estudo realizou-se quatro ciclos de infecção lítica com a cepa Singer, pois as células utilizadas são menos susceptíveis ao BVDV do que as células bovinas (Tabela 1). A expansão e clonagem das células sobreviventes resultaram em populações puras de células resistentes, derivadas de células com o mesmo fenótipo que já estavam presentes - em uma frequência baixa - na população parental. Um procedimento semelhante (clonagem a partir de células IB-RS-2 contaminadas), porém sem a realização das infecções líticas para destruir as células susceptíveis, foi utilizado para selecionar uma linhagem de células livres e resistentes ao vírus da Peste Suína Clássica (HOUSE et al., 1988). Nos experimentos de seleção e

caracterização da linhagem CRIB, observou-se que a inoculação de células MDBK com a cepa Singer em altos títulos resultou na sobrevivência de um número pequeno de células (estimado entre 10^{-4} e 10^{-5}). Foi a partir da expansão de células sobreviventes à infecção com o BVDV Singer que se obteve a linhagem CRIB (FLORES & DONIS, 1995).

A seguir testou-se a susceptibilidade dessas células ao BVDV, pela inoculação da cepa Singer seguida de IFI 24 horas após. Alguns clones foram infectados e por serem susceptíveis ao vírus foram descartados. Dentre os clones negativos para antígenos virais selecionou-se 11 clones das células MDCK, 11 das células PK-15, e 8 das células RK-13 para expansão. Esses clones apresentaram morfologia e padrão de multiplicação indistinguível aos das células parentais. Para os experimentos seguintes selecionou-se um clone de cada linhagem. Células da linhagem CRFK também foram submetidas a esse procedimento. No entanto, todos os clones obtidos demonstraram ser susceptíveis ao BVDV e foram descartados (dados não mostrados).

Demonstração da resistência ao BVDV

A demonstração inicial de que as linhagens obtidas eram resistentes ao BVDV foi realizada pela pesquisa de antígenos virais por IFI 24h após a inoculação da cepa Singer com uma m.o.i. de 10. As células parentais foram utilizadas como controles. Durante a leitura das lâminas, foram contadas as células positivas para antígenos virais presentes em seis orifícios de lâminas *multispot* (aproximadamente 10^5 células) (Figura 1). Dentre as células MDCK-R e PK-15R não foram detectadas células positivas nos seis orifícios examinados, enquanto que nas células RK-13R foram observadas três células positivas. Esse ensaio permitiu concluir que a frequência de infecção das células MDCK-R e PK-15R, quando inoculadas com o BVDV com uma m.o.i. de 10 é inferior a 10^{-5} , e para as células RK-13R é de $3,3 \times 10^{-4}$ (Tabela 1). Esse procedimento foi repetido várias vezes e a frequência de infecção dessas linhagens foi sempre semelhante.

Comparando-se as freqüências de infecção das células parentais e resistentes, pode-se estimar que as linhagens resistentes sejam aproximadamente >10.000 (MDCK-R), >20.000 (PK-15R) e 600 (RK-13R) vezes menos susceptíveis ao BVDV do que as células parentais (Tabela 1). A susceptibilidade das células MDCK-R e PK-15R – se estimada pela freqüência de células infectadas – foi semelhante à descrita para as células CRIB, enquanto que a susceptibilidade das células RK-13 foi um pouco maior.

A resistência das linhagens selecionadas ao BVDV foi também investigada pela realização de co-cultivos entre células previamente inoculadas com o vírus e células MDBK, seguido da realização de IFI para antígenos virais. Em nenhum dos co-cultivos (MDCK-R+MDBK, PK-15R+MDBK, RK-13R+MDBK) foram detectadas células positivas após quatro dias de co-cultivo, enquanto que os co-cultivos das linhagens parentais foram todos positivos (dados não apresentados). Esses resultados demonstraram que as linhagens testadas não são capazes de suportar mesmo níveis baixos de replicação do BVDV, a exemplo das células CRIB (FLORES & DONIS, 1995; FLORES et al., 1996).

As linhagens celulares selecionadas demonstraram também resistência a outras duas cepas padrão (NADL e Oregon) e a 10 isolados de campo do BVDV. Esse espectro de resistência também foi observado nas células CRIB, que demonstraram resistência aos mais de 50 isolados de BVDV testados até o presente (FLORES & DONIS, 1995; FLORES, E.F., comunicação pessoal). Esse amplo espectro de resistência é importante, pois pode impedir a contaminação acidental com quaisquer amostras de BVDV ocasionalmente presentes no SFB utilizado nos cultivos (FLORES et al., 1996). No entanto, a susceptibilidade dessas células a outros pestivírus (CSFV e vírus da Doença da Fronteira) não foi investigada.

Infecção mediada por polietilenoglicol (PEG)

A base biológica da resistência dessas linhagens foi investigada através da infecção mediada por PEG. Em vários sistemas virais, demonstrou-se que a adição de PEG aumenta a

eficiência da infecção de células de cultivo, favorecendo a ligação das partículas víricas à membrana celular (HOEKSTRA et al., 1989; SARMANTI et al., 1994) ou induzindo a fusão entre o envelope viral e a membrana (HOEKSTRA et al., 1989; ASANAKA & LAI, 1993). Esse procedimento foi utilizado para demonstrar que as células CRIB são resistentes ao BVDV devido a um bloqueio na penetração do vírus. Esse bloqueio pode ser parcialmente ultrapassado pelo uso de polietilenoglicol (PEG) ou pela transfecção de RNA viral (FLORES & DONIS, 1995). No presente estudo, a inoculação do BVDV nas células resistentes na presença de PEG a 10% resultou em infecção de 0,437% (437/100.000) das células MDCK-R, 0,346% (346/100.000) das células PK-15R e 0,262% (262/100.000) das células RK-13R. Comparando-se com a frequência de infecção das células resistentes inoculadas na sua ausência, a adição de PEG resultou em aumentos de >437 (MDCK-R); >346 (PK-15R) e 87 (RK-13R) vezes no número de células infectadas (Tabela 2). Para as células CRIB inoculadas na presença de PEG o aumento da frequência de infecção foi de aproximadamente 1.000 vezes (FLORES & DONIS, 1995). Esses resultados indicam que, a exemplo das células CRIB, a principal base biológica da resistência dessas células parece residir em um bloqueio à penetração do vírus. Ou seja, as linhagens resistentes possuem as condições intracelulares para a replicação viral e são permissivas desde que esse bloqueio seja ultrapassado ou revertido.

Considerando-se a susceptibilidade inicial das células resistentes, a adição de PEG resultou na reversão da susceptibilidade ao BVDV na ordem de 4,4% (MDCK-R), 1,7% (PK-15R) e 14,5% (RK-13R). A reversão de susceptibilidade ao BVDV pela adição do PEG, embora de grande magnitude, foi apenas parcial, indicando que o bloqueio à penetração do vírus pode ser apenas parcialmente revertido/ultrapassado pela adição de PEG. Por outro lado, a adição de PEG durante a inoculação do BVDV nas células parentais aumentou moderadamente a frequência de infecção (2,2 vezes para as células MDCK, 1,1 para as PK-15

e 1,7 para as RK-13). Esses resultados sugerem que a deficiência na penetração do vírus não é o principal responsável pela susceptibilidade relativamente baixa das linhagens parentais em comparação com as células MDBK.

Susceptibilidade a outros vírus de interesse

Os resultados até então haviam demonstrado que as linhagens obtidas eram resistentes a três cepas padrão (Singer, NADL e Oregon) e a 10 isolados de campo de BVDV. Esse é um aspecto altamente desejável para evitar possíveis contaminações por esse agente. No entanto, a utilidade potencial dessas células para diversos procedimentos virológicos dependia da sua susceptibilidade a outros vírus de interesse, que rotineiramente são multiplicados nas linhagens parentais. Para se investigar isso, cada linhagem parental e resistente foi inoculada com três vírus diferentes, utilizando-se densidade celular e títulos virais equivalentes. A quantificação da progênie viral presente no sobrenadante dos cultivos 24h após a inoculação demonstrou que as linhagens resistentes apresentam susceptibilidade aos vírus testados semelhante às linhagens parentais (Figura 2). A resistência, portanto, é provavelmente BVDV-específica (ou talvez pestivírus-específica), e não uma consequência da expressão de um mecanismo antiviral inespecífico ou de um defeito estrutural ou metabólico que não permita a replicação viral.

Foi demonstrado que a frequência de infecção das linhagens MDCK-R, PK-15R e RK-13R é de magnitude semelhante à das células CRIB, que quando inoculadas com o BVDV a uma alta multiplicidade, em torno de 10^{-5} a 10^{-6} das células CRIB tornam-se infectadas. Essa frequência baixa de infecção, no entanto, não é suficiente para que o vírus persista no cultivo (FLORES & DONIS, 1995). Aliando-se isso aos títulos geralmente baixos de contaminação do SFB por pestivírus (NUTTALL et al., 1977; BOLIN et al., 1991; BOLIN et al., 1994), é muito provável que pestivírus que eventualmente estejam contaminando o SFB não encontrem condições para sua amplificação e manutenção nesses cultivos.

Várias linhagens celulares de origem animal são susceptíveis à infecção pelo BVDV e conseqüentemente podem ser contaminadas “*in vitro*” (BOLIN et al., 1994; HARASAWA & MIZUSAWA, 1995). Amostras não-citopáticas do BVDV dificilmente são detectadas e, a propagação de vírus nessas células pode interferir no resultado de pesquisas, no diagnóstico de infecções víricas e pode ocasionalmente contaminar estoques de vírus vacinais. O uso de vacinas contaminadas pode produzir doença nos animais vacinados ou induzir soroconversão (VANNIER et al., 1988; WENSVOORT & TERPSTRA, 1988; KREEFT et al., 1990; FALCONE et al., 2000; BARKEMA et al., 2001). Nesse sentido, as linhagens resistentes obtidas nesse experimento podem somar-se aos procedimentos já utilizados para prevenir ou evitar a contaminação de células de cultivo com amostras de BVDV presentes no SFB utilizado em cultivos.

Outra importante aplicação, já demonstrada com as células CRIB (FLORES, E.F. comunicação pessoal), é a possibilidade de descontaminação de estoques de outros vírus (eventualmente já contaminados com o BVDV) através da multiplicação destes nessas linhagens. Ou seja, as células resistentes funcionariam como uma espécie de “filtro”, permitindo a replicação de outros vírus, sem amplificar possíveis pestivírus contaminantes.

Em resumo, foram obtidas linhagens celulares de três espécies animais que apresentam como característica principal a resistência ao BVDV. Essas células podem ter várias aplicações em virologia, sem apresentar o risco de contaminações acidentais por esse agente. Técnicas como o isolamento e multiplicação de vírus, soroneutralização e mesmo a produção de vacinas podem se beneficiar do uso dessas linhagens.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aCultilab LTDA, Campinas, SP, Brasil.

^bSigma Chemical CO., St Louis, MO, USA.

°INLAB produtos químicos, Brasil.

REFERÊNCIAS

ASANAKA, M.; LAI, M.M. Cell fusion studies identified multiple cellular factors involved in mouse hepatitis virus entry. **Virology**, v.197, p.732-741, 1993.

AUDET, S.A. et al. Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. **Biologicals**, v.28, n.1, p.41-46, 2000.

BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.425-445, 1995.

BARKEMA, H.W. et al. Outbreak of bovine virus diarrhoea on dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2. **Tijdschr Diergeneeskde**, v.126, n.6, p.158-165, 2001.

BOLIN, S.R. et al., Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.199-203, 1991.

BOLIN, S.R. et al., Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v. 48, p.211-221, 1994.

FALCONE, E. et al. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. **Vaccine**, n.18, p.387-388, 2000.

FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection due to a block in viral entry. **Virology**, v.208, p. 565-575, 1995.

FLORES, E.F. et al. Swine and ruminant pestiviruses require the same cellular factor to enter bovine cells. **Journal of General Virology**, v77, p.1295-1303, 1996.

FLORES, E.F. et al. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil –

histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.25, v.3, p.125-134, 2005.

FROMMER, W. et al. Safe biotechnology. Recommendations for safe work with animal and human cell cultures concerning potential human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 141-147, 1993.

GIVENS, M.D. et al., Prevention and elimination of bovine viral diarrhea virus infections in fetal fibroblasts. **Antiviral Research**, v.64, n.2, p-113-118, 2004.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H. Demonstration and genotyping of pestivirus RNA from mammalian cell lines. **Microbiology and Immunology**, v.39, n.12, p.979-985, 1995.

HOEKSTRA, D. et al. Mechanism of fusion of Sendai virus: role of hydrophobic interactions and mobility constrains of viral glicoproteins. Effects of polyethylene-glicol. **Journal of Biology and Chemistry**, v.264, p.786-792, 1989.

HOUSE, J.A. et al. Characteristics of the porcine kidney cell line IB-RS-2 clone D10 (IB-RS-2D10) which is free of hog cholera virus. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.24, n.7, p.677-681, 1988.

LEVINGS, R.L., WESSMAN, S.J. Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. **Development of Biological Standards**, v. 75, p. 177-181, 1991.

KREEFT, H.A.I.G. et al. Attempts to characterize bovine viral diarrhea virus isolated from cattle after immunization with a contaminated vaccine. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.97, p.63-65, 1990.

KREUTZ, L.C. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to Brazilian isolates of bovine viral diarrhea virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1459-1466, 2000.

NUTTALL, P.A. et al., Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. **Nature**,

v.266, n.28, p.835-837, 1977.

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

SARMANTI, L. et al. High rate of HIV isolation from plasma of asymptomatic patients through polyethylene-glicol (PEG) treatment. **Journal of Acquired Immunodeficiency Syndromes**, v.7, p.10-14, 1994.

STUDER, E. et al. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. **Biologicals**, n.30, p.289-296, 2002.

VANNIER, P. et al. Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine pestivirus pathogenic for the pig. **Annual Records of Veterinary**, n.19, p.283-290, 1988.

WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. Bovine viral diarrhea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. **Research in Veterinary Science**, v.145, p.143-158, 1988.

WESSMAN, S.J., LEVINGS, R.L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. **Development of Biological Standards**, v.99, p.3-8, 1999.

ZABAL, O. et al. Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.32, n.1, p.27-32, 2000.

Tabela 1. Caracterização das linhagens celulares resistentes ao vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) obtidas a partir de linhagens celulares de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e leporina (RK-13).

Linhagem	Espécie	Célula	Susceptibilidade ao BVDV ^a	Susceptibilidade relativa ao BVDV (vezes) ^b
MDCK	Canina	Parental	13%	
		MDCK-R	$<10^{-5}$	<10.000
PK-15	Suína	Parental	20%	
		PK-15R	$<10^{-5}$	<20.000
RK-13	Coelhos	Parental	5%	
		RK-13R	$3,3 \times 10^{-4}$	600
MDBK	Bovina	Parental	95%	
		CRIB	$<10^{-5}$	<10.000

^aEstimada pela contagem de células positivas na IFI (de um total de aproximadamente 10^5 células) 24 horas após a inoculação com a cepa Singer.

^bA susceptibilidade foi estimada relacionando o número aproximado de células positivas das linhagens resistentes com o número de células positivas nas linhagens parentais.

Tabela 2. Efeito do polietilenoglicol (PEG) na infecção das linhagens celulares de origem canina (MDCK), suína (PK-15) e leporina (RK-13), parentais e resistentes, pelo BVDV.

Linhagem	Células positivas ^a		Aumento da susceptibilidade pelo uso de PEG (vezes) ^b
	Controle	PEG	
MDCK	10%	21%	2,2
MDCK-R	<10 ⁻⁵	437	>437
PK-15	25%	28%	1,1
PK-15R	<10 ⁻⁵	346	>346
RK-13	3,5%	6%	1,7
RK-13R	3,3x10 ⁻⁴	262	87

^aAs células foram inoculadas com 1 m.o.i. da cepa Singer de BVDV, na presença ou na ausência de PEG. A porcentagem de células infectadas pelo BVDV foi estimada pela contagem de células positivas por imunofluorescência indireta 24 horas pós-infecção.

^bSusceptibilidade estimada relacionando-se o número de células positivas por imunofluorescência (COM PEG/ SEM PEG) .

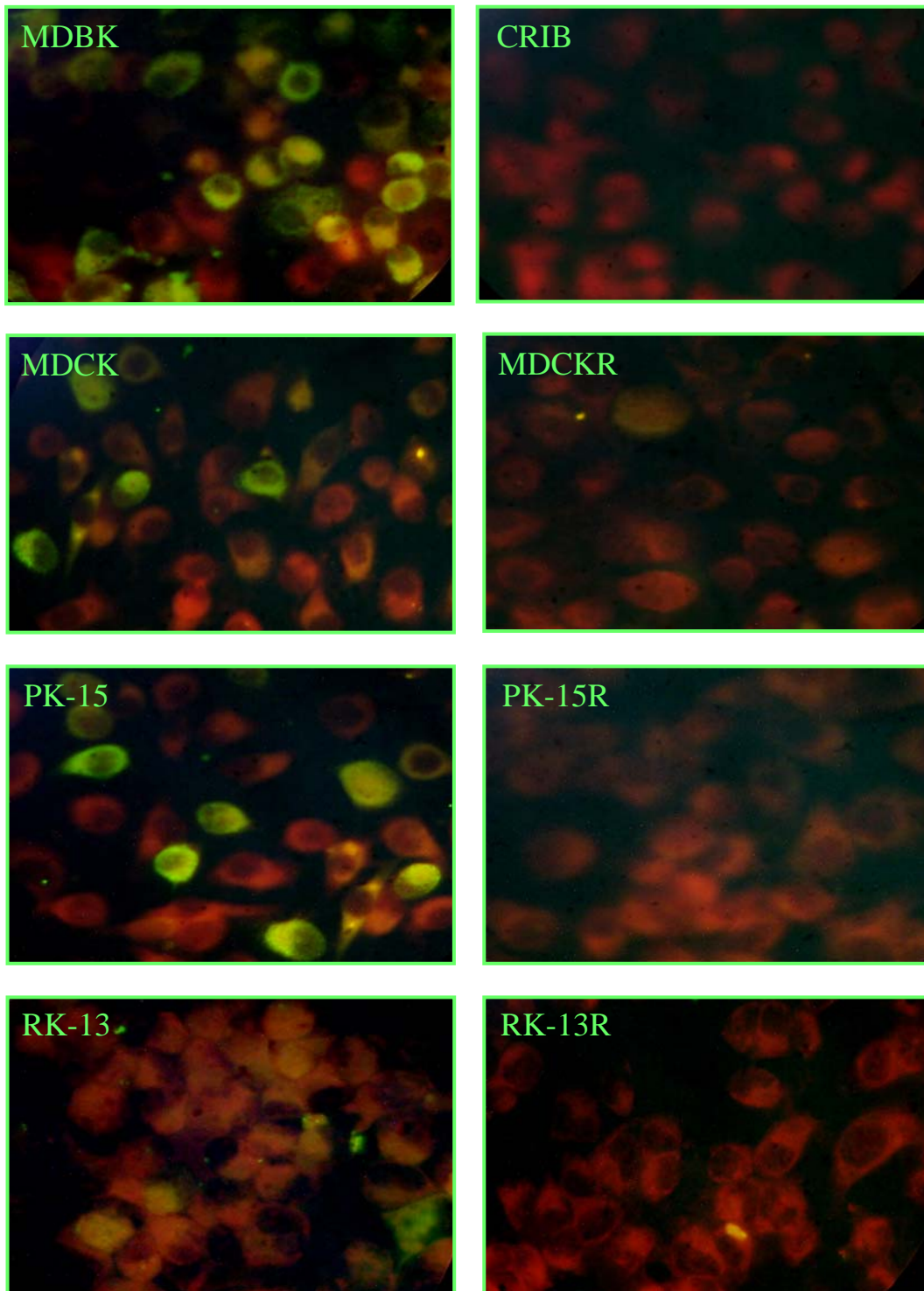


Figura 1. Imunofluorescência Indireta de células MDBK, CRIB, MDCK, PK-15 e RK-13, parentais e resistentes, inoculadas com a cepa Singer a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 10 (ampliação 320x).

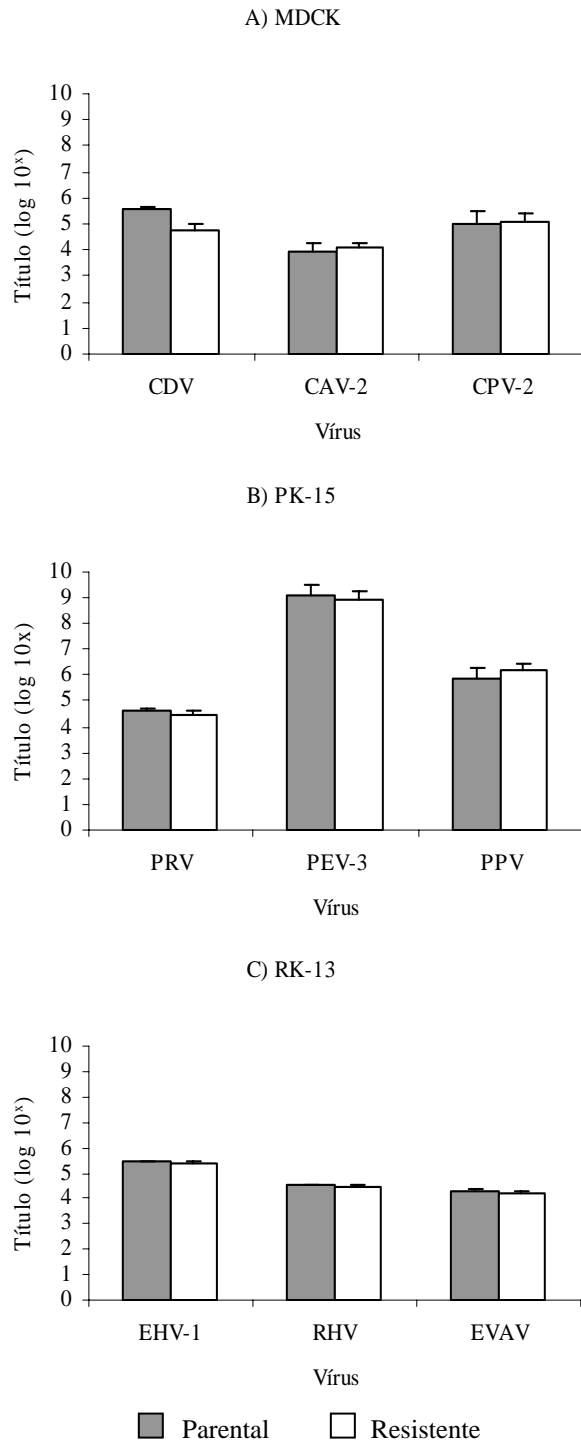


Figura 2. Título viral ($\text{DICC}_{50}/\text{mL}$) nas linhagens parentais e resistentes após a inoculação com diferentes vírus. A) MDCK: adenovírus canino (CAV-2), vírus da cinomose (CDV) e parvovírus canino (CPV); B) PK-15: vírus da doença de Aujeszky (PRV), parvovírus suíno (PPV) e enterovírus suíno (PEV-3); C): RK-13 herpesvírus equino (EHV-1), herpesvírus de coelhos (RHV) e vírus da arterite viral equina (EVAV). Os valores referem-se à média de três repetições.

4. CONCLUSÕES

- As infecções pelo vírus da cinomose (CDV), parvovírus canino (CPV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV) estão disseminadas na população canina de Santa Maria, RS.
- Os índices de prevalência dessas infecções variam amplamente entre os bairros.
- Uma parcela significativa da população canina estudada é soronegativa e portanto susceptível à infecção por esses agentes.
- As linhagens celulares MDCK, PK-15 e RK-13 possuem uma parcela de células que são naturalmente resistentes ao BVDV.
- A infecção dessas linhagens com cepas citopáticas, seleção e clonagem das células sobreviventes constitui-se em um método eficiente para a obtenção de células resistentes ao BVDV.
- O uso de polietilenoglicol resulta em reversão de grande magnitude, porém parcial, da susceptibilidade das linhagens resistentes ao BVDV.
- As linhagens resistentes possuem aplicação potencial para vários procedimentos em virologia.

5. REFERÊNCIAS

APPEL, M.J.G.; PARRISH, C.R. Canine parvovirus type 2. In : APPEL, M.S. **Virus infection of carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p.69-92.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine Distemper: current status. In: CHARMICHAEL, L.E. **Recent Advances In Canine Infectious Diseases**, Ithaca, 1999. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/toc.asp. Acesso em: 19 out. 2005.

AUDET, S.A. et al. Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. **Biologicals**, v.28, n.1, p.41-46, 2000.

BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.11, n.3, p.425-445, 1995.

BINN, L.N. et al. Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhoea. **Proceedings of Annual Meeting US Animal Health Association**, v.78, p.359-366, 1974.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**, São Paulo: Roca, 1998.

BOLIN, S.R. et al., Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.199-203, 1991.

BOLIN, S.R. et al., Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**, v. 48, p.211-221.1994.

FLORES, E.F.; DONIS, R.O. Isolation of a mutant MDBK cell line resistant to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection due to a block in viral entry. **Virology**, v.208, p. 565-575, 1995.

FROMMER, W. et al. Safe biotechnology (5). Recommendations for safe work with animal and human cell cultures concerning potential human pathogens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 141-147, 1993.

FORD, R.B.; VADEN, S.L. Canine infectious tracheobronchitis. In : GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p.33-38.

GOCKE, D.J. et al. Experimental viral hepatitis in the dog: production of persistent disease in partially immune animals. **Journal of Clinical Investigation**, v.46, n.9, p.1506-1517, 1967.

HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v.25, p.77-84, 2001.

LEVINGS, R.L.; WESSMAN, S.J. Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. **Development of Biological Standards**, v. 75, p. 177-181, 1991.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**. 3rd ed. Califórnia : Academic Press, 1999, 629p.

NUTTALL, P.A. et al., Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures. **Nature**, v.266, n.28, p.835-837, 1977.

PRATELLI, A et al. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.550-553, 1999.

PRATELLI, A. Canine Coronavirus Infection. **Recent Advances In Canine Infectious Diseases**, Ithaca, 2005. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/toc.asp. Acesso em: 19 out. 2005.

TRUYEN, U. Canine Parvovirus. In: CHARMICHAEL, L.E. **Recent Advances In Canine Infectious Diseases**, München, 2000. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/toc.asp. Acesso em: 19 out. 2005.

WESSMAN, S.J.; LEVINGS, R.L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. **Development of Biological Standards**, v.99, p.3-8, 1999.