

Efeito da temperatura de estocagem sobre o poder infectante do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina

**Veridiana Munford
Isabela Cristina Simoni**

Seção de Biologia Celular, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, São Paulo, SP, 04014-002, Brasil.

Resumo

O presente trabalho tem a finalidade de estudar a suscetibilidade de duas linhagens celulares renais, uma de bovino (GBK) e outra de coelho (RK₁₃), ao herpes-vírus bovino 1 (BHV-1 = vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina - IBR) e verificar a sua viabilidade a baixas temperaturas.

O BHV-1, quando estocado a -80°C e a -20°C, manteve sua infectividade em ambas as linhagens celulares, durante o período avaliado de 3 meses, embora o título apresentado pelas amostras estocadas a -20°C tenha sido menor que o observado nas amostras estocadas a -80°C. Suspensões virais, acrescidas de glicerina e congeladas a -20°C, mostraram títulos próximos aos observados em amostras congeladas a -80°C, sem glicerina.

Quando estocadas a 4°C, as amostras provenientes de passagens em células GBK permaneceram viáveis por até 44 dias, enquanto que aquelas procedentes de células RK₁₃ mantiveram-se viáveis por 32 dias. Além disso, constatamos que a linhagem GBK é mais suscetível ao BHV-1 do que a linhagem RK₁₃, independente da temperatura em que o vírus foi estocado.

Unitermos: linhagem celular, suscetibilidade, herpes-vírus bovino-1, estocagem.

Summary

The susceptibility of two renal cell lines, one bovine cell line (GBK) and one leporine cell line (RK₁₃) to bovine herpesvirus 1 (BHV-1, infectious bovine rhinotracheitis virus- IBR) as well as the ability of this virus to survive at low temperatures, were studied in the present paper.

The infectivity of BHV - 1 was maintained during the 3 months testing period when stored at -80°C and -20°C. Nevertheless, samples kept at -20°C presented lower titles than those stored at -80°C. Samples kept at -20°C in the presence of a cryoprotectant and samples kept at -80°C presented similar titles.

Samples from GBK and RK₁₃ cells, stored at 4°C, remained viable after 44 and 32 days, respectively. Furthermore, GBK were more susceptible than RK₁₃ cells to BHV-1, independently of the storage temperature.

key words: Cell line, susceptibility, bovine herpesvirus 1, storage.

Introdução

As células de animais são utilizadas em estudos que vão desde a determinação de diferentes efeitos sobre o comportamento celular pela adição de moléculas específicas, tais como hormônios, inseticidas, bem como para estudos morfológicos e fisiológicos. É possível ainda estudar as interações entre diversos tipos de células ou entre estas e parasitas intracelulares como vírus e outros microrganismos (Freshney, 1987).

O herpes-vírus bovino I pode ser cultivado em células de animais, tanto em culturas primárias quanto em contínuas. As mais utilizadas são as linhagens RK₁₃ e MDBK. A replicação do vírus induz ao efeito citopático nestas células, que é facilmente visualizado em microscópio óptico.

O herpes-vírus bovino I causa uma doença denominada de rinotraqueíte infecciosa bovina e que afeta as vias respiratórias. Seu estudo é de grande importância, uma vez que, sendo altamente contagiosa, pode causar sérios problemas à pecuária, chegando a alcançar o índice de 100% de morbidade em um rebanho suscetível. Além disso, esta virose se desenvolve em diversas espécies animais, principalmente ruminantes e já foi identi-

Efeito da temperatura sobre o poder infectante do BHV-1

ficado no Brasil (Mueller et al., 1981; Ikuno et al., 1984; Boher et al., 1987; Bartha, 1988).

Vários autores têm relatado que os herpes-vírus, tais como o de bovinos e de suínos, dependendo da estirpe viral, são estáveis a 4°C e instáveis em temperaturas que variam de -15°C a -20°C (Davies e Beran, 1981; Gustafson, 1981; Straub, 1990).

A estabilidade dos herpes-vírus é variável dependendo das suas características próprias, da metodologia empregada para a sua conservação, da amostra viral utilizada, etc.... Assim, dependendo dos métodos de conservação, os resultados podem diferir quanto ao tempo de estocagem em que os vírus permanecem viáveis. Aderca (1979), estudando condições adequadas de estocagem de diferentes estirpes do vírus herpes simples, observou diferenças dos títulos destas, após 6 meses de estocagem, nas mesmas condições.

Outros estudos vêm sendo realizados em busca de métodos para uma melhor preservação dos herpes-vírus, tais como a presença de aditivos protéicos, crioprotetores, temperatura de estocagem, tempo de congelamento e descongelamento (Scott e Woodside, 1976; Aderca, 1979; Lancz, 1979; Damonte et al., 1981).

O presente trabalho tem a finalidade de estudar a suscetibilidade de duas linhagens renais, uma de bovino (GBK) e outra de coelho (RK₁₃) ao herpes-vírus bovino I, amostra Los Angeles (LA) e avaliar a conservação do vírus estocado nas temperaturas de 4°C, -20°C e -80°C.

Material e Métodos

Linhagens celulares: Linhagem celular de rim de coelho RK₁₃ - ATCC-CCL37 (Beale et al., 1963), cedida pelo Instituto Desidério Finamor do Rio Grande do Sul e linhagem celular de rim de bovino GBK (Smith et al., 1975) cedida pela Dra. Maria José de Oliveira Angelo do Instituto de Biociências da USP. As culturas celulares foram mantidas, nas mesmas condições, em meio Eagle mínimo (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB).

Amostra viral: Foi utilizado o herpes-vírus bovino I, estirpe Los Angeles, cedido pelo Instituto Desidério Finamor do Rio Grande do Sul, com 4 passagens em células de testículos de terneiro e 2 em células da linhagem RK₁₃, com título de 10^{5,25} TCDI₅₀/25ml. Para os experimentos foram utilizadas amostras virais obtidas após 3 passagens em células RK₁₃ e 7 em células GBK. Esta amostra foi denominada de amostra inicial.

Passagem do vírus: Monocamadas celulares confluentes, em garrafas de 75 cm², previamente lavadas com solução fisiológica de Hanks, foram inoculadas com 0,1 ml da suspensão viral e incubadas durante 30 min, a 37°C. Em seguida, as células foram reincubadas com 5 ml de MEM, sem SFB, durante 72 horas. O efeito citopático nas monocamadas foi monitorado diariamente ao microscópio óptico invertido.

Titulação do vírus: Células da linhagem GBK foram utilizadas para a titulação em microplacas de 96 orifícios semeadas com 3,0 x 10⁴ células/0,1 ml e incubadas por 24 h, a 37°C, em ambiente com 5% de CO₂ em MEM acrescido de 10% de SFB. Em seguida, o meio foi retirado e em seu lugar adicionado MEM sem SFB. Foram inoculados 10 ml da suspensão viral até a diluição de 10⁻⁸. O título viral (TCDI₅₀) foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938). Foram realizados três experimentos de titulação das amostras virais.

Estocagem do vírus: Após a passagem da amostra inicial nas duas linhagens celulares, as amostras denominadas de BHV-1/R (provenientes de passagens em células RK₁₃) e BHV-1/G (provenientes de passagens em células GBK) foram distribuídas em alíquotas de 1 ml e estocadas a temperaturas de 4°C, -20°C e -80°C. Nos períodos de 27, 32, 44, 87 e 103 dias de estocagem, a infectividade viral foi avaliada por titulação em células GBK.

Tratamento da suspensão viral com glicerina: Após a passagem da amostra inicial na linhagem GBK, a suspensão viral foi separada em quatro grupos e, em dois grupos, foram adicionados 5% de glicerina. Amostras contendo ou não glicerina foram então assim estocadas:

- congelamento/descongelamento três vezes a -20°C e estocagem a -20°C;
- congelamento/descongelamento três vezes a -80°C e estocagem a -80°C.

Efeito da temperatura sobre o poder infectante do BHV-1

Em dias subsequentes, as alíquotas das amostras foram tituladas como indicado anteriormente e o experimento foi repetido três vezes.

Resultados

Suscetibilidade das linhagens celulares (GBK e RK₁₃) ao BHV-1:

Na tabela I são apresentados os títulos virais provenientes de passagens em células GBK e RK₁₃. Pode-se observar que ambas as células permitiram a multiplicação do vírus, sendo que a linhagem GBK foi mais suscetível que a linhagem RK₁₃.

Tabela 1: Título médio das amostras virais provenientes de passagens em células RK₁₃ (BHV-1/R) e GBK (BHV-1/G), a partir da inoculação da amostra inicial.

Amostra viral	Título TCDI ₅₀ /0,1 ml
BHV-1/R	10 ^{3,66}
BHV-1/G	10 ^{5,66}

Estocagem do vírus

A tabela II apresenta os títulos virais das amostras estocadas, a diferentes temperaturas, durante os períodos de 27, 32, 44, 87 e 103 dias. Pode-se observar que não houve variação considerável nos títulos das amostras estocadas a -80°C e -20°C. Apesar das amostras estocadas a -20°C mostrarem-se infectantes no decorrer dos 103 dias, os títulos destas apresentaram uma diferença de 1,14 log, em média, quando comparados com os observados nas estocadas a -80°C. Além disso, observou-se uma variação média nos títulos das amostras provenientes de passagens em células RK₁₃ (BHV-1/R) menor do que a observada nas amostras procedentes de células GBK (BHV-1/G).

Quando estocada a 4°C, a amostra BHV-1/G permaneceu infectante por até 44 dias, enquanto que a BHV-1/R por até 32 dias, sendo que

ambas não provocaram efeito citopático quando testadas após estes períodos.

Tabela 2: Títulos virais* de amostras provenientes de passagens em células RK (BHV-1/R) e células GBK (BHV-1/G) e estocadas em diferentes¹³ temperaturas.

Amostra viral	Tempo de estocagem (em dias)					
	T°C	27	32	44	87	103
BHV-1/G	-80	6,74	6,33	6,00	6,00	6,33
	-20	5,00	5,00	5,00	5,66	4,66
	+4	3,33	3,00	1,66	-	-
BHV-1/R	-80	4,50	3,50	3,00	4,00	4,50
	-20	3,50	2,66	2,00	3,00	3,00
	+4	1,50	2,00	-	-	-

* Títulos expressos em log TCDI₅₀/0,1 ml

(-) efeito citopático negativo

Análise estatística

Nos resultados obtidos dos experimentos da tabela II foram aplicados os testes F e Tukey ao nível de 5% de probabilidade para análise em blocos casualizados com três tratamentos e cinco repetições.

Análise de variância:

FV	GL	BHV-1/G	BHV-1/R
		F	F
Total	14		
Tratamentos	2	32,25	22,26
resíduo	12		
m.		4,31	2,52
C.V.		22,17 %	30,92 %

FV= fatores de variação; GL= graus de liberdade; m= média; CV= coeficiente de variação.

Efeito da temperatura sobre o poder infectante do BHV-1

Com $F_{5\%} = 3,89$, o resultado é significativo indicando efeito dos tratamentos em 95% dos casos.

média de tratamentos		
-80°C	6,28 a	3,90 a
-20°C	5,06 a	2,96 a
4°C	1,59 b	0,70 b
dms	1,61	1,31

d.m.s. = diferença mínima significativa.

Os efeitos significativos para tratamento, médias seguidas com as mesmas letras são semelhantes pelo teste de Tukey, isto é as amostras estocadas a baixas temperaturas não apresentam diferenças significativas ao passo que nas amostras estocadas a 4°C as diferenças encontradas são significativas.

Tratamento da suspensão viral com glicerina:

A tabela III apresenta os títulos virais das amostras estocadas sob diferentes condições. Pode-se observar que, nas amostras estocadas a -20°C, os títulos obtidos foram próximos daqueles obtidos com as amostras estocadas a -80°C.

Nas amostras congeladas a -20°C, a diferença entre as alíquotas armazenadas com e sem glicerina foi de 1,76 log, enquanto que a diferença observada para as amostras armazenadas com e sem glicerina e estocadas a -80°C foi de 0,74 log.

Tabela 3: Títulos médios* da amostra viral BHV-1/G estocada, com e sem glicerina, e submetida a diferentes processos de congelamento e descongelamento.

Amostra	Grupo 1	Grupo 2
com glicerina	$10^{5,50}$	$10^{6,24}$
sem glicerina	$10^{3,74}$	$10^{5,50}$

Grupo 1: amostra congelada e descongelada três vezes e estocada a -20°C .

Grupo 2: amostra congelada e descongelada três vezes e estocada a -80°C .

* Títulos expressos em TCDI50/0,1 ml

Discussão

As culturas celulares representam o melhor sistema disponível para a multiplicação de vírus, pois eles necessitam da célula hospedeira suscetível para se replicar. A expansão de um determinado vírus requer uma seleção prévia da linhagem celular que apresente permissividade ao mesmo (Schmidt, 1979).

A suscetibilidade de linhagens celulares a um determinado vírus não corresponde necessariamente ao que ocorre *in vivo*. Assim, vírus que são específicos para uma espécie animal *in vivo*, podem se multiplicar, também, em células de outras espécies.

Neste trabalho duas linhagens celulares, uma de rim de coelho RK₁₃ e outra de bovino, GBK, se mostraram suscetíveis ao herpes-vírus bovino I. Porém a linhagem GBK mostrou-se mais sensível do que as células RK₁₃.

Trabalhos que pesquisam a conservação de vírus à baixas temperaturas, mostraram que os herpes-vírus são estáveis a 4°C e -80°C e instáveis entre -15°C e -20°C (Davies e Beran, 1981; Gustafson, 1981; Bartha, 1988). Entretanto, outros estudos indicam que, dependendo da estirpe viral e dos métodos de conservação, os resultados podem diferir quanto ao tempo de estocagem em que os vírus permanecem infectantes (Scott e Woodside, 1976; Aderca, 1979; Lancz, 1979; Damonte et al., 1981).

Efeito da temperatura sobre o poder infectante do BHV-1

No presente trabalho verificou-se que o BHV-1 cepa Los Angeles, quando estocado a 4°C, manteve seu poder infectante por mais de um mês, em meio MEM sem SFB. Straub (1990) verificou que, em presença de 2% de soro, o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina foi inativado após 2 meses de estocagem a 4°C. Já o vírus da pseudorraiva a 4°C foi infectante por até 120 dias, em salina contendo hidrolizado de lactalbumina (Davis e Beran, 1981).

Esta diferença pode depender do meio empregado para a estocagem do vírus como também do sistema celular empregado para a sua replicação. Este fato foi verificado neste trabalho, pois as amostras conservadas a 4°C perderam a infectividade após 30 ou 40 dias dependendo da linhagem celular em que os vírus se multiplicaram. Células mais suscetíveis, como a GBK, cujo rendimento viral normalmente é melhor, apresentaram título infeccioso muito mais tardio (10 dias) quando comparado às células RK₁₃.

O BHV-1 quando estocado, tanto a -20°C como a -80°C, manteve a infectividade durante os 103 dias testados. Straub (1990) verificou que o BHV-1 foi mais estável a temperaturas de -65°C do que -20°C. No entanto, resultados distintos foram verificados com outros herpes-vírus como os de equinos e de patos, que são muito estáveis a -20°C (Bartha, 1988).

É interessante notar que, as suspensões virais congeladas e estocadas a -20°C, apesar de estáveis, apresentaram sempre um título menor do que aquelas congeladas e estocadas a -80°C, em qualquer das células empregadas. Este fato indica que, neste caso, independe do sistema celular utilizado para a replicação do vírus e, portanto, está ligado aos efeitos do congelamento e descongelamento das suspensões virais.

Kato et al. (1990), trabalhando com moléculas protéicas, observaram maior redução na atividade biológica das mesmas, quando estas foram congeladas a -20°C do que quando congeladas a -85°C. Segundo os autores, este fenômeno estaria relacionado não ao período em que a substância protéica foi mantida a baixa temperatura, mas sim ao tempo de duração do processo de congelamento, já que, o tempo de passagem pela zona de solidificação a -85°C foi 50 vezes mais rápido do que a -20°C. Durante o processo de congelamento materiais biológicos passam por um ponto crítico, que é caracterizado pelo momento em que se formam os cristais de gelo, originados pelo congelamento da água. Quanto maior for o tempo

de permanência na zona de solidificação menor será a sua conservação (Meryman, 1960; Gao et al, 1989).

Neste trabalho foi verificado que, as amostras estocadas a -20°C , apesar de permanecerem viáveis no período de tempo avaliado, apresentaram sempre um título menor após o congelamento do que aquelas congeladas a -80°C . Por outro lado, quando adicionou-se a glicerina e as amostras foram submetidas a um congelamento lento, ocorreu uma recuperação da infectividade de 27,5 % e de 13,45 %, nas alíquotas congeladas a -20°C e -80°C , respectivamente.

Pode-se concluir que seria mais indicado estocar amostras de BHV-1 em geladeira quando o mesmo for prontamente utilizado no laboratório ao invés de mantê-lo congelado. Apenas quando for necessário estocar o vírus, por longos períodos de tempo, seria recomendável estocar a baixas temperaturas, ao redor de -80°C . Em laboratórios que não dispõem de congeladores que atinjam temperaturas de -80°C seria indicado adicionar glicerina às suspensões virais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FUNDAP pelo apoio recebido, concedendo bolsa à primeira autora, bem como à Dra Tauba G. Abuhab pela inestimável colaboração.

Referências Bibliográficas

- Aderca, M.I. 1979. Practical aspects of the storage of herpes simplex virus samples. *Rev. Roum. Med. Virol.*, 30: 5-9.
- Bartha, A. 1988. Infecções por herpes virus. In: Beer, J. *Doenças infecciosas em animais domésticos*. Livraria Roco, São Paulo, Vol 1, cap. 17, p. 278-337.
- Beale, A.J.; Christofinis, G.C.; Furminger, I.G.S. 1963. Rabbit cells susceptible to rubella virus. *Lancet*, 2: 640-641.
- Boher, J.L.; Filardi, L.S.; Simon, F.; Ikuno, A.; Mueller S.B.K. 1987. Presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueite infecciosa dos

- bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em capivaras (*Hydrochoerus hydrochoeris*, Lin.). *Arq. Inst. Biol.*, **54**: 45-48.
- Damonte, E.B.; Calello, M.A.; Weissenbacher, M.C.; Coto, C.E. 1981. Condiciones optimas para el mantenimiento de la infectividad del virus tacaaribe ante las variaciones de temperatura. *Rev. Argent. Microbiol.*, **13**: 49-52.
- Davies, E.B.; Beran, G.W. 1981. Influence of environmental factors upon the survival of Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.*, **31**: 32-36.
- Freshney, R.I. 1987. **Culture of animal cells. A manual of basic technique**. 2. cd. Wiley Liss., New York, 397 pp.
- Gao, D.Y.; Lin, S.; Kornblantt, J.A.; Guttman, F.M. 1989. A study of the separate effects of influence factors and their coupled interactions on crioinjury of human erythrocytes. *Criobiol.*, **26**: 355-368.
- Gustafson, D.P. 1981. Herpes virus diseases of mammals and birds. *In*: Gustafson, D.P. **Comparative and diagnosis of viral disease**. Academic Press. New York, Vol. III, Part 4, chapter 5, p. 205-263.
- Ikuno, A.A.; Machado, J.S.; Mueller, S.B.K.; Ribeiro, L.O.C.; Chiba, S. 1984. Presença de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo. *Biológico*, S.P., **50**: 131-138.
- Kato, A.; Kanemitsu, T.; Kobayashi, K. 1990. Effects of freeze-denaturation of ovomacroglobulin on the chymosin inhibition. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 239-240.
- Lancz, G. 1979. Influence of environmental pH on the preservation and inactivation of herpes simplex virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **162**: 238-240.
- Meryman, H.T. 1960. General principles of freezing and freezing injury in cellular materials *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**: 503-509.
- Mueller, S.B.K.; Ikuno, A.A.; Machado, J.S.; Lima, R.M.A.; Richtzenhain, L.J.; Taki, E.M. 1981. Prevalência de anticorpos contra o vírus da rinotraqueíte infecciosa dos bovinos/vulvovaginite pustular infecciosa (IBR/IPV) em bovinos no Estado de São Paulo. *Biológico*, S.P., **47**: 55-59.
- Reed, L.J.; Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end-point. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-497.

- Schmidt, N.J. 1979. Cell culture techniques for diagnostic virology. *In*: Lennette, H.E. and Schmidt, N.J. **Diagnostic procedures for rickettsial and chlamydial infections**. 5. ed. American Public Health Association. Washington, Part 1, Chapter 3, p. 65-140.
- Smith M.H.; Frey M.L.; Dierks R.E. 1975. Isolation, characterization and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus. **Arch Virol.**, **47**: 237-247.
- Scott, E.M.; Woodside, W. 1976. Stability of pseudorabies virus during freeze-drying and storage: effect of suspending media. **J. Clin. Microbiol.**, **4**: 1-5.
- Straub, O.C. 1990. Infectious bovine rhinotracheitis virus. *In*: Dinter, Z. and Morein, B. **Virus infections of ruminants**. Elsevier. New York. Chapter XI, p. 71-99.