

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CONSELHO DE PÓS-GRADUAÇÃO
ESCOLA DE VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS
CELULARES ST, PK₁₅ e SK₆ AO PARVOVÍRUS SUÍNO

ANTONIO CARLOS CARNEIRO DE MIRANDA

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS
1992

ANTONIO CARLOS CARNEIRO DE MIRANDA

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS LINHAGENS
CELULARES ST, PK₁₅ e SK₆ AO PARVOVÍRUS SUÍNO

Dissertação apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Medicina
Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS
1992

M672a Miranda, Antônio Carlos Carneiro de, 1946-
Avaliação da sensibilidade das linhagens
celulares ST, SK6 e PK15 ao parvovirus suí-
no / Antônio Carlos Carneiro de Miranda. -
Belo Horizonte: UFMG- Escola de Veterinária,
1992.

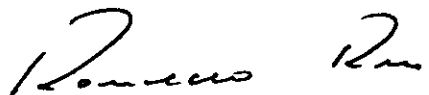
49 p. : iL. -

Dissertação (Mestrado)

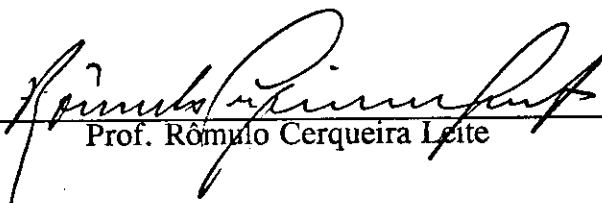
1. Parvovirose - Teses. 2. Parvovírus -
Teses. 3. Suíno - Doenças - Teses. I. Títulos.

CDD - 636.408.969 - 2

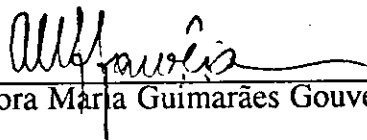
Aprovada em: 08/06/92



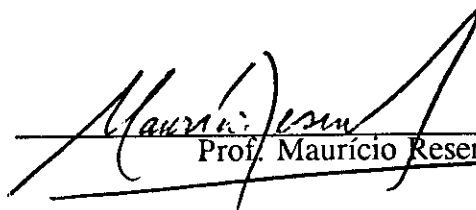
Prof. Ronaldo Reis
Orientador



Prof. Rômulo Cerqueira Leite



Prof^a. Aurora Maria Guimarães Gouveia



Prof. Maurício Resende

À minha esposa Maria Anita e aos meus
filhos Frederico, Patrícia e Natália pelo
sacrifício, estímulo, apoio e carinho.

À memória de meu pai e à minha mãe
pelo muito que me deram.

AGRADECIMENTOS

À Professora Aurora Maria Guimarães Gouveia pelas correções apresentadas.

Ao Prof. Maurício Resende pelas sugestões para continuidade das pesquisas.

Ao Professor Ivan Barbosa Machado Sampaio pela ajuda na estatística.

A colega Zélia Inês Portela Lobato pela valiosa colaboração.

À Doracy pela amizade e constante apoio no laboratório de cultivo celular.

Ao colega e amigo Andrey que muito colaborou para o andamento dos trabalhos.

Aos colegas e amigos do curso de Pós-Graduação.

À colega Inês Boaventura pela amizade e ajuda prestada.

À amiga e bibliotecária Eunice de Faria Lopes e aos funcionários da biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG pelos serviços prestados.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFMG pela colaboração.

Ao amigo Vinhal do Laboratório de Imunologia da UFU pela elaboração dos gráficos.

Ao amigo Gerson do Laboratório de Genética da UFU pela digitação deste trabalho.

Aos meus irmãos Afrânio Mauro, Maria Augusta, Ieda, Vera, Hécio e Heloisa pelo carinho e incentivo.

Ao meu sogro Américo e a minha sogra Maria Imaculada pelo constante estímulo.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela receptividade.

Aos colegas do Departamento de Medicina Animal da UFU pelo apoio.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade.

À todos que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Ronaldo Reis pela receptividade, estímulo, amizade e participação neste trabalho.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite pela amizade e apoio, no fornecimento das condições básicas para a realização da fase experimental do trabalho.

Ao meu irmão Lúcio Flávio, sua esposa Eunice e filhos, pela especial colaboração.

Ao meu amigo e cunhado José Carlos Nogueira pelo exemplo e incentivo em toda a minha vida profissional.

A Deus pelo muito que tenho.

RESUMO

Foram determinadas as sensibilidades de três linhagens celulares (ST, SK6 e PK15), a duas amostras de parvovírus suíno (PVS-1-campo e NADL-2-padrão), através das curvas de replicação viral baseadas nos efeitos citopáticos e títulos hemoaglutinantes determinados a cada 12 horas, durante um período de observação de 120 horas.

As avaliações foram realizadas por análise comparativa entre os percentuais dos efeitos citopáticos obtidos e as variações entre os títulos hemoaglutinantes observados nas diluições dos vírus frente as três linhagens celulares.

A maior sensibilidade foi verificada para a linhagem celular ST que mostrou resultados de títulos hemoaglutinantes altos e efeitos citopáticos característicos, seguida pela linhagem SK6 sendo a PK15 a menos sensível.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Sensibilidade e resistência celular ao PVS.....	03
2.2 Características gerais do PVS.....	05
2.3 Replicação, purificação e titulação do parvovírus suíno (PVS)	06
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Células.....	08
3.1.1 Padronizações celulares	08
3.1.2 Controles das culturas celulares	09
3.1.2.1. Comprovação da espécie de origem celular.....	09
3.1.2.2. Cariotipagem.....	09
3.1.2.3. Pesquisa de contaminantes.....	10
3.2 Vírus.....	10
3.2.1. Amostras usadas.....	10
3.2.2 Produção das sementes	11
3.2.3 Títulos hemoaglutinantes	11
3.3 Pré-Experimento-1	11
3.4 Pré-Experimento-2 - Titulação das amostras PVS-1 e NADL -2 em células ST.	12
3.5 Experimento Final - Determinação das curvas e titulação das amostras PVS-1 e NADL-2 em células PK-15 e ST.....	12

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Padronizações celulares	14
4.2 Controles celulares	15
4.2.1 Comprovação de origem	15
4.2.2 Cariotipagem	15
4.2.3 Pesquisas de contaminantes	15
4.3 Pré-Experimento-1 - Verificação comparativa da sensibilidade entre linhagens celulares ao PVS	15
4.4 Pré-Experimento-2 - Titulação e curva de crescimento das amostras PVS-1 e NADL-2 em células ST	17
4.5 Experimento Final - Curva de replicação das amostras PVS-1 e NADL-2 em células ST e PK 15	19
4.5.1 Curvas das amostras NADL-2 e PVS-1 em células ST	19
4.5.2 Curva de replicação do PVS em células PK15	21
4.6 Outras observações	22
5. CONCLUSÕES	23
6. TABELAS	25
7. GRÁFICOS	35
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 - INTRODUÇÃO

A moderna suinocultura industrial no Brasil tem praticado um sistema de produção com base no confinamento estrito associado a programas dinâmicos de melhoramentos genético, nutricional, de manejo e de saúde.

Este sistema de criação praticado apresenta várias características vantajosas visando a uma maior produtividade. Por outro lado, o confinamento dos animais em gaiolas reduz a exposição a agentes patogênicos ou potencialmente patogênicos aumentando a susceptibilidade e manifestação clínica de certos problemas sanitários.

Dentre estes, a parvovirose suína é reconhecidamente um dos mais sérios e endêmicos problemas da suinocultura industrial em todo o mundo sendo considerada como a principal causa de transtornos reprodutivos principalmente mumificação fetal, leitegadas pequenas, mortalidade embrionária e repetição de cio e por isso de importância econômica indiscutível (CARTWRIGHT & HUCH, 1967, MENGELING & CUTLIP, 1975, PERESTRELO, 1987, JOO, 1992).

No Brasil, são poucos os trabalhos sobre a parvovirose suína. Estudos sorológicos em Minas Gerais demonstram que 55,3% dos animais foram reagentes com títulos significativos. Todos os rebanhos estudados apresentaram animais reagentes (GOUVEIA, 1982).

Em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, estudos conduzidos por MARTINS et al (1984) mostram reações sorológicas positivas em cerca de 80% dos animais testados.

A vacinação tem sido mundialmente utilizada na prevenção da doença, seja através de vacinas inativadas (JOO & JOHNSON, 1977, MENGELING et al 1979, JOO & MOLITOR, 1984, WRATHALL, 1984, VANNIER, 1986, PYE, D. & BATES, J., 1990) ou de vacina viva (PAUL & MENGELING, 1980), produzidas em diferentes sistemas celulares.

LOBATO (1990), trabalhando com cultivo primário de rim suíno, desenvolveu uma vacina inativada capaz de induzir resposta sorológica em 88,68% dos suínos vacinados.

A maior dificuldade na produção de vacinas inativadas relaciona-se à obtenção regular *in vitro* de massa antigênica com títulos satisfatórios, provavelmente devido à presença de partículas vazias ou defectivas surgidas durante a replicação, havendo competição com as partículas infectantes, pelos receptores antigênicos celulares (CHOI, 1987, COTMORE & TATTERSAL, 1987).

A sensibilidade celular ao PVS foi objeto de estudo de vários autores. CARTWRIGHT et al (1969) encontraram sensibilidade para as linhagens celulares PK, PT e Hela. PIRTLE (1974) constatou que células originadas de suínos foram mais sensíveis que as de outras espécies. Para BACKMANN & DANNER (1976) a linhagem de maior sensibilidade foi a SK6. STEPANEK et al (1979) descreveu a linhagem PK15 como não sensível. PEEV et al (1986) relatam como não sensíveis as linhagens IBRS2, PK15 e SPEV.

Em consequência à diversidade dos resultados encontrados foi objetivo principal deste trabalho comparar a sensibilidade à replicação do PVS em três linhagens contínuas (ST, SK6 e PK15) visando contribuir para viabilizar a obtenção de massa viral que possibilite a produção de vacinas e, de antígenos para uso em diagnósticos além de oferecer subsídios técnicos para isolamentos do vírus.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Sensibilidade e resistência celular ao PVS.

CARTWRIGHT et al (1969) em isolamentos de PVS, utilizaram células de cultivo primário de rim suíno (PK), cultivo primário de testículo suíno (PT), rim bovino (CK), testículo bovino (CT), testículo de carneiro, rim de macaco, rim canino, HEP2 e Hela em isolamentos de PVS. As células PK, PT e Hela foram sensíveis e as demais foram resistentes. O estudo seqüencial da ação replicativa do vírus foi realizado por observação do ECP e pesquisa de hemoaglutininas.

PIRTLE, (1974) avaliou a susceptibilidade de 15 linhagens celulares de sete espécies de mamíferos a uma amostra de PVS isolada de trato respiratório superior de suínos. As células de origem suína foram as mais sensíveis, principalmente as de tireóide de suínos adultos em baixa passagem, células de rim e pulmão de embrião e a linhagem celular PT de testículos.

Em trabalho realizado por BACKMANN & DANNER (1976) não foram encontradas diferenças significativas em títulos infecciosos máximos e hemoaglutininas após a replicação do PVS "in vitro" sob temperaturas de 28°C, 33°C e 37°C.

STEPANEK (1979), trabalhando em isolamentos do PVS em leitões natimortos, considerou a linhagem celular PK15 como não sensível ao PVS.

PAUL & MENGELING (1980), em trabalho de preparação de antígeno para produção de vacinas vivas, utilizaram como substrato a linhagem ST e células de rim fetal suíno (PFK). Consideraram a célula ST mais adequada para a produção do vírus, com obtenção de títulos infecciosos altos.

PEEV et al. (1986) testaram a sensibilidade de vários cultivos celulares ao PVS. Os cultivos primários e secundários de rim suíno foram susceptíveis à replicação, enquanto as linhagens contínuas IBRS2, PK15 e SPEV, se mostraram não sensíveis. Descrevem que na ausência do ECP o melhor teste para detecção do PVS é a hemoaglutinação (HA).

WOSU (1987) para otimizar a produção e isolamento do PVS, analisou o efeito da concentração celular na produção viral encontrando para a linhagem celular suína PS $1,0 \times 10^5$ células/ml como a concentração ideal para obtenção do PVS com 64 UHA, (unidades hemoaglutinantes). Foram analisadas também a concentração de SFB, da ação de inibidores do soro e da estocagem do PVS.

HARDING, & MOLITOR (1988) estudaram a replicação do PVS em macrófagos alveolares e linfócitos sanguíneo de suínos. Observaram que estes sistemas celulares são também sensíveis ao vírus. Nos linfócitos apesar de presentes, só iniciam a replicação após adição de estimulantes mitogênicos.

KAWAMURA et al (1988), trabalharam com a linhagem celular ESK (embrião de rim suíno) a 37°C e 5% de CO₂ para titulação do PVS a partir da formação de placas, considerando esta linhagem celular como a mais sensível.

Vários aspectos da ação do PVS "in vitro" foram acompanhados por BERNIS (1990) que relata ser a sensibilidade celular e a ação replicativa do vírus dependentes não só da fase S da mitose, mas também do estado de diferenciação celular. Descreve também que células transformadas são mais susceptíveis à replicação viral.

2.2 - Características Gerais do PVS

RHODE III (1978) estudou os aspectos estruturais das partículas completas do parvovírus H-1. Observou que existiam partículas defectivas que continham modificações genômicas e eram capazes de interferir na infecciosidade do vírus e na síntese protéica do capsídeo.

Em estudos conduzidos por COTMORE & TATTERSAL (1987) sobre a replicação dos parvovírus autônomos dos vertebrados, concluíram que são teratogênicos, e que afetam células em rápido desenvolvimento, daí sua ação replicativa em fetos. Por exigirem alto índice mitótico celular, tem tropismo por células em fase S.

Os parvovírus são partículas isométricas não envelopadas com 20 a 25nm e fita simples de DNA e, podem gerar grande número de capsídeos vazios e partículas defectivas que contem quantidades submolares de DNA. Relatam que a proporção de partículas completas e vazias varia segundo o tipo celular e o vírus, mas as vazias podem exceder em número, 2 a 50 vezes às completas. A partícula vazia tem capsídeo normal e DNA subgenômico variável.

Os parvovírus clássicos são partículas estáveis, resistentes a solventes lipídicos, à variação de pH entre 3,0 e 9,0, aquecimento a 56°C e a altas concentrações salinas. O congelamento e descongelamento são prejudiciais à sua integridade. São diferenciados uns dos outros, pelos determinantes antigênicos na partícula intacta.

Descrevem ainda a competição entre partículas completas e vazia pelos receptores celulares específicos, e que uma única partícula é capaz de gerar infecção. A infecção promove a morte celular e em algumas células quando são feitas culturas continuadas, podem surgir como resultado, colônias resistentes ao vírus.

CHOI et al (1987), trabalhando "in vitro" e "in vivo", evidenciam a ação das partículas vazias do PVS, demonstrando que a produção de partículas extra e intracelulares são marcadamente inibidas pelas partículas vazias.

Em sistema celular ST, comprovaram que a adição prévia de partículas vazias diminui a ação infecciosa das partículas completas.

KRELL et al (1988), estudando o genoma do PVS por análise de enzima de restrição e hibridização durante o desenvolvimento de uma sonda de DNA para PVS, afirmam ser este muito estável, através de passagens seriadas "in vitro" e "in vivo". Não ficou evidente para eles a presença de partículas defectivas e vazias.

2.3 - Replicação, purificação e titulação do PVS

O efeito da variação da temperatura na replicação "in vitro" do PVS foi estudado por BACKMANN (1972) em células SK O acompanhamento da ação viral foi realizado por titulação por HA até 120 horas de leitura, observando títulos semelhantes em temperaturas diferentes considerando-se os pontos máximos, sendo encontrado, porém, atrasos na ação viral quando havia diminuição da temperatura. Ficou claro que a curva da replicação tem relação direta com a variação do índice mitótico celular em decorrência das variações das temperaturas.

MENGELING (1972) infectou culturas de células ESK com PVS diluído a 10^{-1} e 10^{-2} com 2 horas de adsorção a 37°C , usando titulação por hemoaglutinação à 22°C e a 4°C , não encontrando diferenças entre títulos nas duas temperatura. Pela imunofluorescencia detectou presença de partículas, 7 1/2 horas após infecção. Após 24 horas, 40 a 60% das células estavam com presença do PVS intranuclear e intracitoplasmática. Posteriormente, houve predominância de produção viral citoplasmática havendo também inibição de mitose celular.

BACKMANN & DANNER (1976) estudando os fenômenos de produção viral a diferentes temperaturas (28, 33 e 37°C) e relacionando com a mitose celular e síntese de DNA, encontraram que apesar do grau de síntese de DNA e o índice mitótico serem diferentes, a infectividade e produção de hemoaglutinação foram similares. Usaram neste trabalho linhagem celular SK6 por considerá-la a mais sensível.

Para demonstrar a prevalência do PVS em rebanhos suínos do estado de Minas Gerais, GOUVEIA (1982) utilizou a linhagem celular PK15 para isolamentos do vírus, empregando para comprovação e titulação das amostras isoladas o método da hemoaglutinação.

Sensibilidades celulares ao PVS foram pesquisadas por PEEV (1982) relatando que além do efeito citopático - (ECP), o teste da hemoaglutinação é um bom método para mensurar o PVS em cultivos celulares.

EDWARDS & THORNTON ((1984), titularam o PVS em microplacas pelo método da hemoaglutinação. Empregaram cinco diluições do vírus. Utilizando hemácias de cobaias e após 1 a 2 horas a 4°C realizavam as leituras.

Para a produção de antígenos vacinais, WRATHAL et al (1984) também testaram a infectividade da suspensão virulenta obtida pelo método da hemoaglutinação.

HARDING & MOLITOR (1988) replicaram o PVS em macrófagos alveolares e linfócitos sanguíneos periféricos, observando que a quantidade de DNA viral e progênie do vírus são dependentes da multiplicidade da infecção e do tempo após infecção.

KAWAMURA et al (1988), demonstram que o ECP é inadequado para titulações porque nas diluições terminais a leitura é inconclusiva. O ponto final foi determinado por hemoaglutinação ou imunofluorescência. Citam ainda que a formação de placas durante a replicação pode ser usada para cálculos nas diluições onde são formadas, considerando estas formações de placas como satisfatórias para titulações.

LOBATO (1990), observando o comportamento do PVS em células de cultivo primário de rim suíno, purificou o vírus por diluição em ponto final, usando diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-7} , encontrando ser o ECP inadequado para titulações e a hemoaglutinação um bom parâmetro.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Células

Para avaliação da sensibilidade celular ao PVS, foram utilizadas as linhagens celulares contínuas ST (Swine Testis) cedida pelo C.N.P.S.A - EMBRAPA, SK6 cedida pelo LARA-MG e PK15 cedida pelo CPFA (Centro Panamericano de Febre Aftosa).

3.1.1 - Padronizações Celulares

Os cultivos celulares para as três linhagens, passaram por padronizações de processos, para melhor observação e uniformização dos resultados da ação dos vírus. Para tanto, foram comparados os efeitos das variações nas concentrações celulares iniciais dos cultivos, com 2,0, 3,0, 3,5, e 4,0 x 10⁵ células/ml observando-se o comportamento do crescimento celular.

Os frascos usados nas culturas foram das marcas CORNING e DESCARPLAST com 25 cm².

Para o crescimento das linhagens PK15 e SK6 o meio de cultura usado foi o EAGLE-MEM acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) e o meio DULBECCO'S-MEM (SIGMA) com 10% de SFB para a linhagem ST. Em todos os

meios de cultura, foram adicionados penicilina (200 UI/ml), e estreptomicina sulfato (0,2mg/ml).

As incubações das culturas foram realizadas a 37°C em estufa com câmara úmida e atmosfera com 5% de CO₂.

Variações no enriquecimento dos meios de cultura ocorreram segundo as exigências de cada tipo celular. A tripsinização foi realizada com STV (Solução tripsina verseno) a 0,25%, e o tempo necessário para formação das monocamadas foi de 48 a 72 horas em média, para as concentrações celulares iniciais de 6,0 e 7,0 x 10⁴ células/cm². De cada frasco de cultura obtido, preparavam-se três frascos nos subcultivos.

3.1.2 - Controle das culturas celulares

Para as três linhagens foram realizados os seguintes testes:

3.1.2.1 - Comprovação da espécie de origem das linhagens celulares.

Foi realizada nos laboratórios da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) pelo processo de pesquisa enzimática, utilizando-se a determinação da velocidade de migração de três sistemas de isoenzimas (glucose-6-fosfato desidrogenase-6 GPD, desidrogenase lítica-LD e nucleosídeo fosforilase NP), segundo o método descrito em Quality Control Methods for Cell Lines, (1985).

3.1.2.2 - Cariotipagem:

Usada para verificação do padrão cromossômico das linhagens celulares.

Esta etapa foi desenvolvida no laboratório de genética do Departamento de Zootecnia da EV-UFMG. Às culturas provenientes do laboratório de cultivo celular foi adicionada colchicina 0,0016% (Sigma Chemical Company), sendo posteriormente tripsinizadas com STV 0,25%. Após, seguiu-se a hipotonização (KCl - 0,075M) e a

fixação do material em ácido acético e metanol 3:1. A etapa seguinte constituiu no preparo das lâminas para microscopia óptica e fotomicrografias. As melhores fotomicrografias foram utilizadas para montagem dos cariótipos.

3.1.2.3 - Pesquisa de contaminantes

A eventual presença de contaminantes víricos para parvovírus foi pesquisada pela realização da prova de hemoaglutinação nas três linhagens celulares, durante as várias fases de sua utilização.

A esterilidade para bactérias e fungos foi comprovada pelos métodos convencionais em meios de cultura para aeróbios, anaeróbios e para fungos e incubação a 37°C e temperatura ambiente.

Pesquisa de micoplasma foi também realizada por verificação indireta em cultura de células, pelo método descrito em Quality Control Methods for Cell Lines (1985). Constitui-se na inoculação de 0,5 ml de suspensão da célula a ser testada, em células VERO cultivadas em lâminas e incubadas a 37°C por cinco dias. Após este período são fixadas em ácido acético e metanol e posteriormente coradas para leitura.

3.2 - Vírus

3.2.1 Amostras usadas:

- a) NADL-2 considerada padrão, adaptada em cultivo celular (cedida pela Universidade da Califórnia - Davis - USA)
- b) PVS-1 amostra de campo, isolada na Escola de Veterinária da UFMG, a partir de fetos mumificados, abortos e natimortos (GOUVEIA, 1982).

A amostra usada foi multiplicada inicialmente por três passagens em cultivo primário de rim suíno e, purificada por diluição em ponto final (LOBATO, 1990).

3.2.2 - Produção das sementes

Monocamadas de células ST com cerca de 70% de confluência foram lavadas duas vezes com PBS, pH 7,2 e infectadas com 0,5ml de suspensão virulenta, sem diluir e diluída a 10^{-1} . Após inoculação foram incubadas a 37°C por um período de 60 minutos para permitir a adsorção vírica aos receptores celulares. A seguir, lavou-se novamente com PBS pH 7,2 para retirar o excesso de vírus e após, foi adicionado 5 ml do meio de manutenção com 2% de SFB. Em seguida foi incubada a 37°C em câmara úmida e 5% de CO₂ e observou-se o ECP a cada 12 horas por microscopia. Quando o ECP atingia 90% aproximadamente, os frascos foram congelados e descongelados duas vezes a -70°C, e a cultura colhida para determinação do título hemoaglutinante. A suspensão foi dividida em alíquotas e estocada a -70°C para posterior utilização, segundo (EDWARDS, 1984; PIRTLE, 1974).

3.2.3 - Títulos hemoaglutinantes

A prova de hemoaglutinação usada para titulação das sementes e dos antígenos obtidos nos pré-experimentos e experimento final, foi feita em microplacas fundo em "V", seguindo o método descrito por GOUVEIA, (1982).

3.3 - PRÉ-EXPERIMENTO 1 - Verificação comparativa da sensibilidade das linhagens celulares ao PVS

As amostras sementes, PVS-1 (rim suíno) e NADL-2, ambas com títulos hemoaglutinantes 1:256, foram utilizadas em quatro passagens sucessivas para cada tipo celular, em quatro repetições de cada passagem. A metodologia empregada para as infecções foi a mesma descrita anteriormente para a produção de sementes.

3.4 - Pré-experimento 2 - Titulação das amostras PVS-1 e NADL-2 em células ST

Neste experimento as duas amostras do parvovírus foram passadas uma vez em ST e sofreram diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-10} . Como diluente foi usado o meio Dulbècco, pH 7,2 sem SFB. As suspensões diluídas foram divididas em alíquotas e estocadas a -70°C .

Cultivos celulares com cerca de 70 a 75% de confluência, após lavados duas vezes em PBS, pH 7,2 foram infectados com 0,5 ml de cada diluição das duas amostras virais, utilizando-se cinco frascos por diluição.

Durante um período de 120 horas, foram realizadas microscopia em intervalos de 12 horas, para estimativa dos percentuais de ECP. No momento das leituras, amostras eram colhidas para determinação dos títulos hemoaglutinantes.

3.5 - EXPERIMENTO FINAL: Determinação das curvas e titulação das amostras PVS-1 e NADL-2 em células PK15 e ST

Com base nos resultados dos pré-experimentos 1 e 2, as amostras semente PVS-1 e NADL-2 com títulos hemoaglutinantes conhecidos (1:1024), foram usadas como inóculos para a célula considerada mais sensível e também para a menos sensível.

Cinco diluições e quatro repetições de cada diluição, caracterizando um delineamento inteiramente casualizado, constituíram os critérios para as avaliações. EAGLE-MEM, pH 7,2, sem SFB foi o meio utilizado para as diluições das amostras semente, que após divididas em alíquotas foram estocadas a -70°C até o uso (PIRTLE, 1974).

As inoculações dos vírus eram praticadas quando as monocamadas atingiam cerca de 70 a 75% de confluência celular e após, lavadas duas vezes com PBS pH 7,2, usando-se um inóculo de 0,5ml de cada diluição em quatro frascos e incubados a 37°C por 60 minutos para adsorção das partículas virais.

Após adsorção e lavadas mais duas vezes, receberam o meio de manutenção, sendo levadas novamente para incubação em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, por um período máximo de 120 horas.

Durante o período de incubação, a replicação viral foi acompanhada por microscopia com intervalos de 12 horas para observações do ECP característico do PVS (CARTWRIGHT et al, 1969). Ao atingir 90% aproximadamente de efeito citopático, os frascos eram congelados e descongelados duas vezes. Após descongelamento o extrato obtido era centrifugado a 300 x g por cinco minutos para separação dos restos celulares e a suspensão resultante submetida à prova de hemoaglutinação.

Os resultados dos títulos hemoaglutinantes e os percentuais de ECP, a cada 12 horas, foram utilizados para a elaboração da curva de produção dos vírus.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Padronizações celulares

O início de cultivo da linhagem ST foi mais laborioso devido às condições da amostra recebida e adequações dos meios em utilização para as culturas. Após adaptação, as culturas mostraram uniformidade morfológica e de comportamento na multiplicação celular, atingindo confluência total após 48 a 72 horas conforme a concentração inicial. O pH do meio mostrou sempre tendência a alcalinidade o que ficou demonstrado ser característica da célula ST já que o mesmo meio de cultura frente as outras células acidificava rapidamente exigindo correções.

Sob a tripsinização a linhagem ST mostrou facilidades de trabalho evidenciando células bem individualizadas após curto período de exposição em estufa a 37°C.

Após padronizadas, foram congeladas em diferentes passagens para posterior utilização. Nos congelamentos observou-se que a viabilidade celular foi melhor com meio acrescido de 20% SFB e 10% de DMSO e não com 7% de DMSO e 15% de SFB conforme preconizado para esta linhagem.

A célula SK6 não exigiu na fase de padronizações maiores cuidados e estudos, mostrando sempre uniformidade no comportamento após definidos os componentes do meio de cultivo, sendo entre as três linhagens a de maior rendimento.

Além disso, era a que mais facilmente atingia o crescimento ideal após descongelamento, mostrando ser a de mais fácil tripsinização. A célula PK15 foi a que apresentou maiores dificuldades na fase de padronização. Foi também a mais difícil de ser tripsinizada, exigindo trocas ou maior quantidade de tripsina e ainda maior tempo de exposição a ação da mesma. Houve ainda em relação à célula PK15 uma tendência à formação de ilhas ou agrupamentos celulares durante os cultivos, impedindo uma monocamada perfeita. Exigia normalmente mais de 72 horas para o fechamento.

4.2 - Controles das culturas celulares

4.2.1 - Comprovação de origem

Os resultados obtidos, confirmaram ser as amostras das três linhagens em uso pertencentes à espécie suína.

4.2.2 - Cariotipagem

Observou-se pelas reproduções das metáfases obtidas, que as três linhagens celulares mantiveram-se dentro de seu padrão cromossômico durante o experimento, confirmando assim, a não ocorrência de contaminações por outras linhagens celulares.

4.2.3 - Pesquisas de contaminantes

As amostras mães das três linhagens, mostraram-se isentas de vírus hemoaglutinantes, micoplasmas, bactérias e fungos. Estes testes foram repetidos durante o andamento dos trabalhos, sem demonstrar presença de quaisquer contaminantes.

4.3 - Pré-Experimento 1-Verificação comparativa da sensibilidade entre linhagens celulares, ao PVS.

Os resultados mostraram que a linhagem celular PK15 foi a menos sensível, a SK6 mostrou sensibilidade intermediária e a ST foi a mais sensível. Em

células PK15, a amostra PVS-1 não mostrou ECP nem produção de hemoaglutininas nas quatro passagens realizadas (TAB-I e II).

Diluições duplas do vírus foram feitas na tentativa de verificar e eliminar possíveis bloqueios celulares por partículas vazias e, novas infecções foram feitas. Porém os resultados foram negativos (TABELA V). Estes resultados sugerem que a ausência de replicação viral nestas células não está relacionada à presença de partículas vazias e sim devido provavelmente a pouca sensibilidade celular.

A interferência na infecciosidade das partículas virais foi observada por RHODE III (1978) quando estudava a estrutura das partículas do parvovírus H.1. Esta interferência foi comprovada por bloqueio celular com partículas vazias realizado por CHOI et al (1987) em pesquisa de ação replicativa do PVS "in vitro" quando adicionavam concentrações conhecidas destas partículas antes da infecção com amostras infecciosas.

Em estudos dos parvovírus autônomos COTMORE & TATTERSAL (1987) relatam a ação competitiva das partículas vazias e completas pelos receptores celulares.

A amostra NADL-2 em células PK 15 não apresentou ECP até a 4ª passagem, mostrando porém hemoaglutinação a partir da 3ª passagem (TAB. II). Estes índices hemoaglutinantes foram baixos mesmo sendo a amostra já adaptada a células.

Os resultados da TABELA III mostram a maior sensibilidade da célula SK6 em relação a PK15, indicada pelas presenças de ECP e títulos hemoaglutinantes nas quatro passagens. Para BACKMANN & DANNER (1976) a linhagem celular SK6 foi considerada a mais sensível.

Em células ST, os resultados foram marcadamente melhores, mostrando desde a primeira passagem, intenso efeito citopático e títulos hemoaglutinantes com valores de até 1:4096, para as duas amostras, PVS-1 e NADL-2 (TABELA IV). Esta

observação quanto à célula ST está concordante com os resultados de PAUL & MENGELING (1980) que indicam maior sensibilidade para esta linhagem.

Os resultados observados neste pré-experimento estão de acordo com os trabalhos de CARTWRIGHT et al (1969), PIRTLE (1974) e PEEV (1986), quanto à sensibilidade de células renais e testiculares de origem suína.

Por outro lado algumas linhagens de origem suína mostraram resultados diferentes, como a célula PK15, que foi considerada como sendo não sensível nos trabalhos realizados por STEPANEK (1979) e PEEV (1986). Estes resultados são semelhantes aos encontrados em nossas observações onde a célula PK15 foi muito pouco sensível frente às duas amostras de PVS utilizadas.

Cultivos primários de células embrionárias ou fetais de suínos principalmente as de rins e testículos foram utilizadas para replicação do PVS, CARTWRIGHT (1967), PAUL & MENGELING (1980), PEEV (1986), KAWAMURA (1988), LOBATO (1990) que obtiveram resultados satisfatórios. No entanto, para BERNIS (1990) que estudou aspectos da replicação do PVS "in vitro" relata que as células transformadas são mais susceptíveis devido em parte à regulação diferencial da expressão dos promotores responsáveis pelas transcrições genômica das proteínas não estruturais encontrados nestas células.

Em nossos estudos foi também objeto de análise o efeito da concentração celular na produção viral, conforme realizado também por WOSU (1987) que encontrou valores diferentes devido provavelmente à utilização de outro tipo celular.

4.4 - Pré-Experimento-2- Titulação e curva de crescimento das amostras PVS-1 e NADL-2 em células ST.

O comportamento da produção viral para as amostras PVS-1 e NADL-2, ficou demonstrado pelas variações ocorridas nas manifestações dos ECP e dos títulos hemoaglutinantes, entre os inóculos sem diluição e nos diluídos até 10^{-4} , observados nos

valores máximos nos GRÁFICOS 1 e 3 e 2 e 4, ou nas médias destes resultados (TAB. VI-VIII e VII-IX). Foi observado que o início da ação replicativa do vírus é determinada pela presença de células em suspensão a partir de 12 horas após infecção (p.i.), antes de se caracterizar o ECP. Há uma dependência entre tempo de infecção e quantidade de inóculo para haver esta manifestação.

Os ECP característicos, observados às 24 horas p.i., estão de acordo com as descrições de CARTWRIGHT et al (1969). A intensidade do efeito era maior à medida que aumentava o tempo de incubação.

Observou-se diminuição do crescimento celular pela ação dos vírus, proporcional ao tempo de cultura e à quantidade de vírus, conforme observado também por HARDING & MOLITOR (1988), que descrevem ser a produção de DNA viral dependente do grau de infecção e do tempo de incubação, mesmo utilizando sistema celular diferenciado (macrófagos alveolares e linfócitos) que exigem estimulantes mitogênicos.

Nos inóculos sem diluição, os títulos hemoaglutinantes foram altos desde 24 horas p.i e atingiram 1:4096 às 48 horas. Para o inóculo diluído a 10^{-1} , variações do ECP podem ser vistos para as duas amostras até 72 e 84 horas, quando houve lise praticamente total com títulos HA altos verificados por seus valores máximos (GRÁFICOS 1-3 e 2-4) ou nas médias destes resultados (TAB. VI-VIII e VII-IX).

Títulos hemoaglutinantes podem ser observados mesmo quando não há ECP presente, o que ocorreu após 24 horas de incubação na diluição 10^{-2} do PVS-1 (GRÁFICOS 1 e 2 e TABELAS VI e VII) mostrando ser realmente a hemoaglutinação a prova de escolha para a identificação do PVS. A pesquisa de hemoaglutininas e o seu uso para titulação do PVS é fato observado também por vários autores (BACKMANN, 1972; GOUVEIA 1982; EDWARD & THORNTON 1984; WRATHAL 1984; PEEV 1986; LOBATO 1990), sendo considerado o método de escolha. Estes títulos foram crescentes até atingirem 1:2048 quando o ECP era característico.

A observação de títulos altos ocorreu, mesmo quando a lise celular não foi total conforme visto em 10^{-3} e 10^{-4} às 120 horas p.i. (GRAF. 1 e 2) e (TAB. VI e VII).

Para as diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , não houve manifestação de ECP nem presença de hemoaglutinação, observando-se apenas descamações celulares devidas, provavelmente, ao envelhecimento da cultura de forma semelhante ao ocorrido nas células controle no mesmo período.

Durante o estudo da amostra NADL-2 houve falta de energia elétrica com conseqüente resfriamento das culturas inoculadas. Os frascos foram mantidos na estufa para observações nos mesmos critérios afim de se observar os fatos ocorridos. Conforme esperado, houve paralisação da ação viral apesar de estarem as células em boas condições conforme acompanhamento microscópico também das células controle. 12 horas após reaquecimento ocorreu um brusco aparecimento de manifestação viral, com títulos altos nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} que já haviam antes mostrado início de lise celular. A amostra não diluída já apresentava ECP total quando houve a paralisação.

Para as diluições de 10^{-3} a 10^{-7} nada foi observado, já que não havia ainda iniciado a manifestação do PVS, quando da falta de energia. As manifestações de reativação em 10^{-1} e 10^{-2} foram registradas até 120 horas pelos índices máximos (GRÁF. 3) ou pelas médias destes (TAB. VIII).

4.5 - Experimento final: Curva de replicação das amostras PVS-1 e NADL-2 em células ST e PK15.

4.5.1 - Curvas de produção das amostras NADL-2 e PVS-1 em células ST.

As culturas celulares usadas nesta fase para inoculações estavam com 160 passagens.

Nas amostras sem diluição, não foram observados ECP e os títulos hemoaglutinantes foram muito baixos nas primeiras 12 hs. A partir de 24 hs p.i

mostraram presença de células em suspensão e início de modificações morfológicas, com irregularidades nos contornos, granulações, vacuolização citoplasmática e aumento no tamanho celular, sem limites intercelulares definidos conforme observado nas células controle. Possivelmente estas modificações ocorridas podem ser usadas como um indicativo da ação viral. Não foram encontradas na literatura consultada, informações sobre estas modificações morfológicas, ocorridas em nosso trabalho.

O núcleo se mostrou mais distendido e houve tendência de queda na velocidade de multiplicação das células, o que é notado pela diferença de pH entre células controle mais acidificadas e células infectadas (com tendência a alcalinidade ou menor acidificação dependendo da diluição do vírus). BACKMANN & DANNER (1976), descrevem a presença de corpúsculo de inclusão com 10 horas p.i e células redondas após 24 horas de incubação.

Apesar de estarem as células aparentemente normais após 12 horas de infecção, os resultados dos títulos hemoaglutinantes mesmo baixos indicam presença de ação viral. Notamos aqui mais uma vez a sensibilidade do teste da hemoaglutinação para o PVS.

Estes títulos hemoaglutinantes subiram significativamente a partir de 24 horas de forma coerente com as modificações morfológicas, atingindo 1:256 para as duas amostras e sem ter ainda uma manifestação clara do ECP, identificados nos GRÁFICOS 6 e 8 ou pelas médias dos resultados (TAB. XI e XIII).

Às 36 horas p.i foi possível quantificar o ECP, 30% aproximadamente para as duas amostras e com títulos hemoaglutinantes de 1:512. Os gráficos 5-7 e 6-8 mostram ECP e títulos máximos e as médias, apresentadas nas TABELAS X-XII e XI-XIII.

Mudanças ocorreram até 72 horas p.i quando a lise celular foi total e os títulos hemoaglutinantes atingiram 1:4096 para NADL-2 e 1:2048 para o PVS-1 (GRAF. 6 e 8 e TAB. XI e XIII).

Para o inóculo diluído a 10^{-1} as reações das duas amostras foram notadas após 36 horas com ECP e às 24 horas com presença detectável de hemoaglutininas, sendo crescentes até 84 horas para NADL-2 e 108 horas para o PVS-1, com valores de 1:2048 e 1:1024, respectivamente (GRAF. 5-7 e 6-8 e TAB. X-XII e XII-XIII).

Tempo maior para o início de ECP na amostra PVS-1 foi observado nas diluições 10^{-2} e, às 96 horas em 10^{-3} . Estes valores foram crescentes até às 120 horas com 100% de lise para o NADL-2, com título hemoaglutinante de 1:2048 em 10^{-2} . Em 10^{-3} o título foi menor e o ECP não foi total.

As diferenças notadas entre PVS-1 e NADL-2 estão provavelmente relacionadas à adaptação celular maior da amostra NADL-2. No entanto, devido ser alto o título da semente usada, os valores finais obtidos para as duas amostras são semelhantes.

Nas diluições 10^{-4} e 10^{-5} somente a amostra NADL-2 mostrou ECP após 108 horas sendo os títulos hemoaglutinantes relativamente baixos para as duas amostras (GRAF. 6-8 e 5-7 e TAB. X-XII e XI-XIII).

Foi observado que os títulos hemoaglutinantes podem aumentar mesmo após ser o ECP aparentemente total (90 a 100%), verificação feita quando amostras deixadas por 24 horas a mais em incubação mostraram títulos maiores. Este fato deverá ser melhor estudado posteriormente, mas deve estar relacionado provavelmente ao maior número de partículas virais liberadas das células neste período.

4.5.2 - Curva de replicação do PVS em células PK15.

Efeitos pouco significativos e não característicos de ECP com presença de células em suspensão, foram observados para as duas amostras só após 108 hs p.i nos inóculos não diluídos. Os títulos hemoaglutinantes máximos para estas amostras foram de 1:64 (GRAF. 9 e 10). Os títulos para as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram baixos até 120 horas. As médias dos resultados encontram-se nas TABELAS XIV e XV.

A presença de hemoaglutinação sem apresentar ECP foi também observada em células PK15, mostrando ser a hemoaglutinação um teste confiável para a identificação do PVS, mesmo quando há possivelmente pequena produção viral.

4.6 - Outras Observações

Os resultados obtidos em células ST no pré-experimento 2, sugerem não ter havido interferência de partículas vazias porque em passagens sucessivas não houve queda da infecciosidade (TAB. IV). MOLITOR (1983) sugere que o PVS não é defectivo. KRELL et al (1988), trabalhando com análise de restrição enzimática (endonuclease), descrevem ser o genoma do PVS muito estável não mudando após passagens seriadas "in vitro" e "in vivo", sendo necessário verificar se ocorre a produção destas partículas e, se é sempre durante a replicação vírica. Não ficou claro para eles que sempre ocorra a presença destas partículas vazias e ou defectivas. A presença e concentração das possíveis partículas vazias, deverá ser pesquisada em amostras de nossos estudos segundo o método descrito por CHOI et al (1987)

5 - CONCLUSÕES

- 5.1 - A linhagem celular ST é a mais sensível, sendo a de escolha para isolamentos e produção de massa antigênica, seja destinada à produção de vacinas ou a testes de diagnóstico.
- 5.2 - A linhagem celular SK6 mostrou sensibilidade intermediária podendo também ser usada para produção de antígenos e tentativas de isolamento do PVS.
- 5.3 - A linhagem celular PK15 é pouco adequada para a replicação do PVS não sendo, ao que parece, recomendada principalmente para isolamentos iniciais. Ficou claro este fato porque mesmo usando amostras com títulos altos os resultados obtidos foram baixos.
- 5.4 - Quando o título infeccioso do inóculo é alto e a célula sensível, diluições de até 10^2 podem ser usadas para produção de antígenos, evitando-se provavelmente a presença de partículas vazias, além de proporcionar maior rendimento das sementes disponíveis e estocadas, por consumo em menor quantidade.

5.5 - Desde que a sensibilidade da célula em uso seja alta, a possibilidade de se conseguir a manifestação do vírus passa a ser grande mesmo em isolamentos iniciais, com obtenção de ECP extenso e títulos hemoaglutinantes presentes. É necessário no entanto, que a amostra em estudo contenha quantidades mínimas necessárias para manifestação replicativa do vírus. Este fato pode ser observado quando usando a mesma amostra em células PK15 e ST os resultados foram diferentes.

5.6 - A produção viral pode variar conforme o percentual de confluência celular $< 50\%$ ou $> 75\%$ no momento da inoculação da amostra e, da capacidade infecciosa ou título da amostra.

5.7 - Para titulações, o ECP parece não ser boa escolha porque não permite além da diluição 10^{-5} obter leituras precisas, impossibilitando assim, a definição do ponto final e portanto o cálculo do título infeccioso

5.8 - As diferenças morfológicas observadas principalmente em células ST quando infectadas, são indicativos claros de ação do PVS.

TABELA I

Títulos hemoaglutinantes e presença de ECP obtidos em células PK15, ST e SK6 nas passagens 1^a, 2^a, 3^a e 4^a para a amostra viral PVS-1

PASSAGENS	ECP			TÍTULO		H.A.
	PK15	ST	SK6	PK15	ST	SK6
1 ^a	-	+	+	0	1:1024	1:128
2 ^a	-	+	+	0	1:1024	1:128
3 ^a	-	+	+	0	1:2048	1:128
4 ^a	-	+	+	0	1:1024	1:256

TABELA II

Títulos hemoaglutinantes e presença de ECP das amostras PVS-1 e NADL-2 em células PK15 em quatro passagens com quatro repetições.

PASSAGENS	REPETIÇÕES	ECP		TÍTULOS H.A	
		PVS-1	NADL-2	PVS-1	NADL-2
1 ^a	1 ^a	-	-	0	0
	2 ^a	-	-	0	0
	3 ^a	-	-	0	0
	4 ^a	-	-	0	0
2 ^a	1 ^a	-	-	0	0
	2 ^a	-	-	0	0
	3 ^a	-	-	0	0
	4 ^a	-	-	0	0
3 ^a	1 ^a	-	-	0	1:16
	2 ^a	-	-	0	1:32
	3 ^a	-	-	0	1:16
	4 ^a	-	-	0	1:32
4 ^a	1 ^a	-	-	0	1:32
	2 ^a	-	-	0	1:64
	3 ^a	-	-	0	1:32
	4 ^a	-	-	0	1:32

TABELA III

Títulos hemoaglutinantes e presença de ECP das amostras PVS-1 e NADL-2 em células SK6, com quatro passagens e quatro repetições.

PASSAGENS	REPETIÇÕES	ECP		TÍTULOS H.A	
		PVS-1	NADL-2	PVS-1	NADL-2
1 ^a	1 ^a	+	+	1:128	1:256
	2 ^a	+	+	1:256	1:256
	3 ^a	+	+	1:128	1:256
	4 ^a	+	+	1:256	1:256
2 ^a	1 ^a	+	+	1:256	1:128
	2 ^a	+	+	1:128	1:256
	3 ^a	+	+	1:128	1:512
	4 ^a	+	+	1:256	1:256
3 ^a	1 ^a	+	+	1:256	1:512
	2 ^a	+	+	1:256	1:256
	3 ^a	+	+	1:128	1:256
	4 ^a	+	+	1:128	1:256
4 ^a	1 ^a	+	+	1:256	1:512
	2 ^a	+	+	1:256	1:256
	3 ^a	+	+	1:256	1:256
	4 ^a	+	+	1:256	1:512

TABELA IV

Títulos hemoaglutinantes e presenças ECP obtidos em células ST para as amostras PVS-1 e NADL-2 em quatro passagens com quatro repetições.

PASSAGENS	REPETIÇÕES	ECP		TÍTULOS H.A	
		PVS-1	NADL-2	PVS-1	NADL-2
1 ^a	1 ^a	+	+	1:1024	1:2048
	2 ^a	+	+	1:1024	1:1024
	3 ^a	+	+	1:512	1:1024
	4 ^a	+	+	1:1024	1:1024
2 ^a	1 ^a	+	+	1:2048	1:2048
	2 ^a	+	+	1:2048	1:2048
	3 ^a	+	+	1:4096	1:2048
	4 ^a	+	+	1:4096	1:4096
3 ^a	1 ^a	+	+	1:512	1:1024
	2 ^a	+	+	1:1024	1:2048
	3 ^a	+	+	1:1024	1:1024
	4 ^a	+	+	1:1024	1:1024
4 ^a	1 ^a	+	+	1:512	1:4096
	2 ^a	+	+	1:1024	1:4096
	3 ^a	+	+	1:2048	1:1024
	4 ^a	+	+	1:2048	1:4096

TABELA V

Títulos hemoaglutinantes e presenças de ECP em células PK15 após quatro diluições duplas do PVS-1 em três passagens sucessivas.

PASSAGENS	DILUIÇÕES DO VÍRUS	ECP	TÍTULOS H.A.
1 ^a	1:2	----	0
	1:4	----	0
	1:8	----	0
	1:16	----	0
2 ^a	1:2	----	0
	1:4	----	0
	1:8	----	0
	1:16	----	0
3 ^a	1:2	----	0
	1:4	----	0
	1:8	----	0

TABELA VI

Médias dos percentuais dos efeitos citopáticos (ECP) da amostra PVS-1 em células ST (Pré-experimento-2)

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)										
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	12	
0											
10 ⁰ 54			80	95							
10 ⁻¹ 30			50	72	90						
10 ⁻²				48	64	88					
10 ⁻³				8	12	18	30	32	32		
10 ⁻⁴						8	12	12			

TABELA VII

Médias de títulos hemoaglutinantes da amostra PVS-1 em células ST (Pré experimento - 2).

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)										
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
10 ⁰	0	768	1843	2867							
10 ⁻¹	0	358	870	1109	2304						
10 ⁻²	0	128	281	435	922	896	1433				
10 ⁻³	0	0	83	128	256		845	512	896		
10 ⁻⁴	0	0	0	0	58	128	128	128	922	1024	

TABELA VIII

Médias dos percentuais dos efeitos citopáticos (ECP) da amostra NADL-2 em células ST (Pré-experimento-2)

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)										
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	12	
0											
10 ⁰	0	46	80	93							
10 ⁻¹		14	40	50	50	86					
10 ⁻²				14	14	38			72	86	
10 ⁻³						8			34	48	
10 ⁻⁴						5			16	18	

TABELA IX

Médias de títulos hemoaglutinantes (HA) da amostra NADL-2 em células ST - (Pré-experimento-2)

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)										
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	
10 ⁰	0	1024		2867							
10 ⁻¹	0	128	256			1433					
10 ⁻²	0	128	128							1288	
10 ⁻³	0	0	32						819	1024	
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	38	128	539	

TABELA X

Médias dos percentuais dos efeitos citopáticos da amostra PVS-1 em células ST (Experimento final).

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)									
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
10 ⁰			43	70	85	90				
10 ⁻¹			8	33	45	63	80	80	88	
10 ⁻²						15	23	38	50	65
10 ⁻³								5		10

TABELA XI

Médias de títulos hemoaglutinantes da amostra PVS-1 em células ST (Experimento final)

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)									
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
10 ⁰	2,5	208	832	832	1024	2048				
10 ⁻¹	0	128	128	224	320		512	512	768	1024
10 ⁻²	0	53	96	128	128		128	341	536	576
10 ⁻³	0	0	4,5	12		24	32	64	96	144
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	5		8	16	20
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	11	6	8	24

TABELA XIV

Médias de títulos hemoaglutinantes da amostra PVS-1 em células PK - 15 (Experimento final)

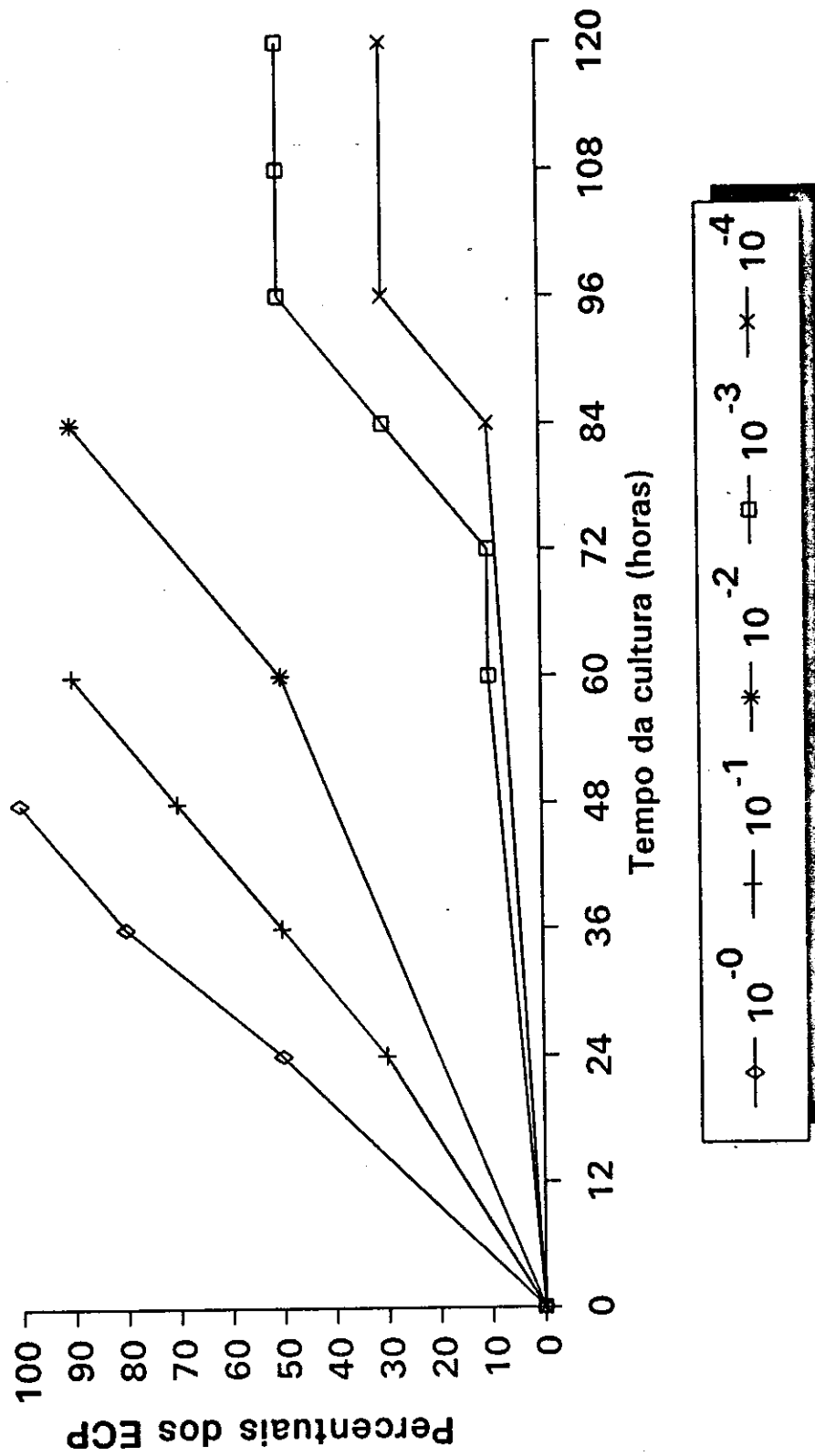
DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)									
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
10 ⁰	18	32	28	28	28	40	40	56	64	56
10 ⁻¹	0	0	6	10	16	16	28	24	32	28
10 ⁻²	0	0	4	4	4	6	8	7	9	12

TABELA XV

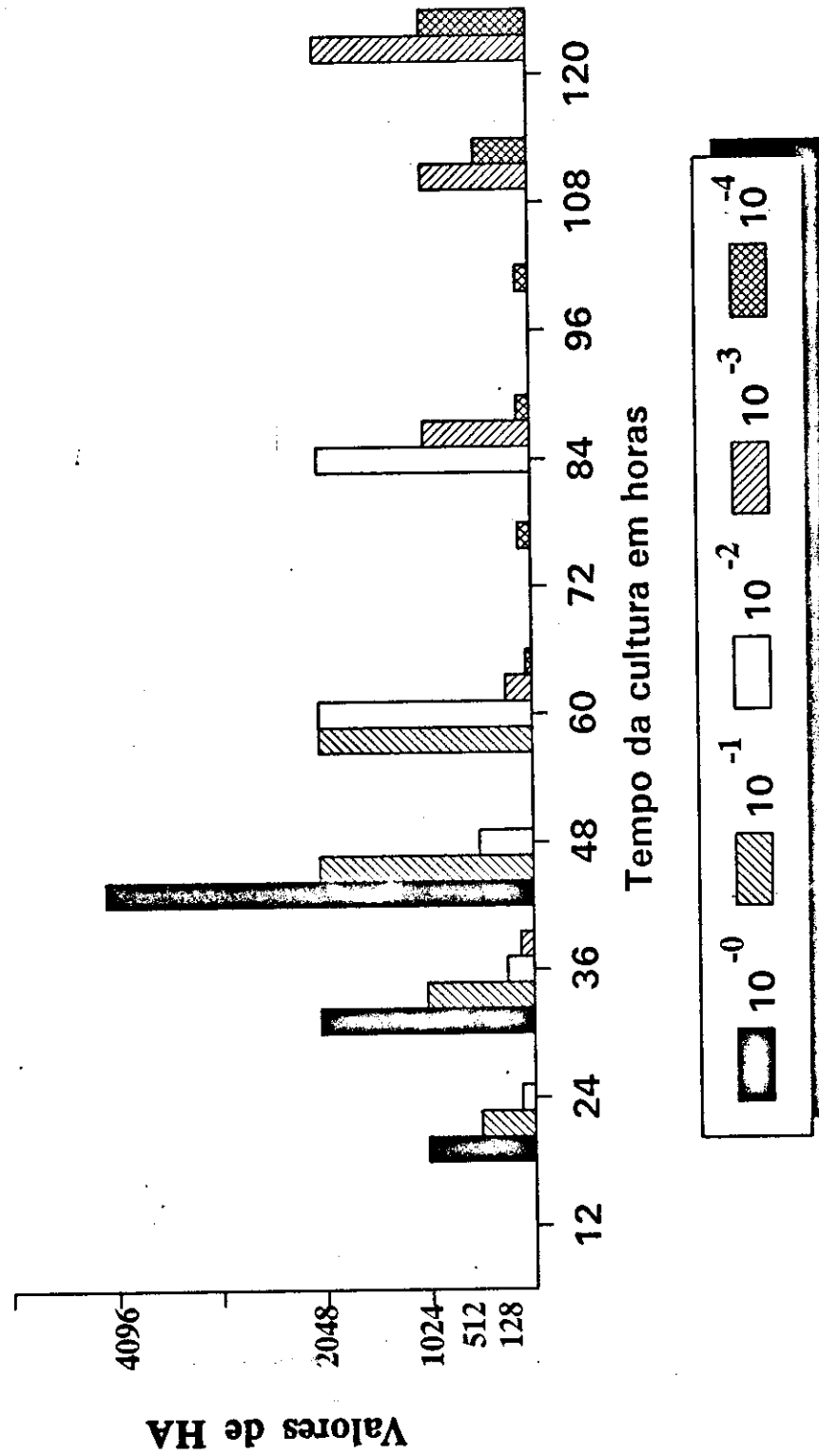
Médias de títulos hemoaglutinantes da amostra NADL-2 em células PK-15 (Experimento final)

DILUIÇÕES DO VÍRUS	TEMPO DAS CULTURAS (HORAS)									
	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
10 ⁰	0	16	16	26	28		32	32	40	48
10 ⁻¹	0	0	0	8	12	18	24	32		32
10 ⁻²	0	0	0	0	0	6	18	24	24	

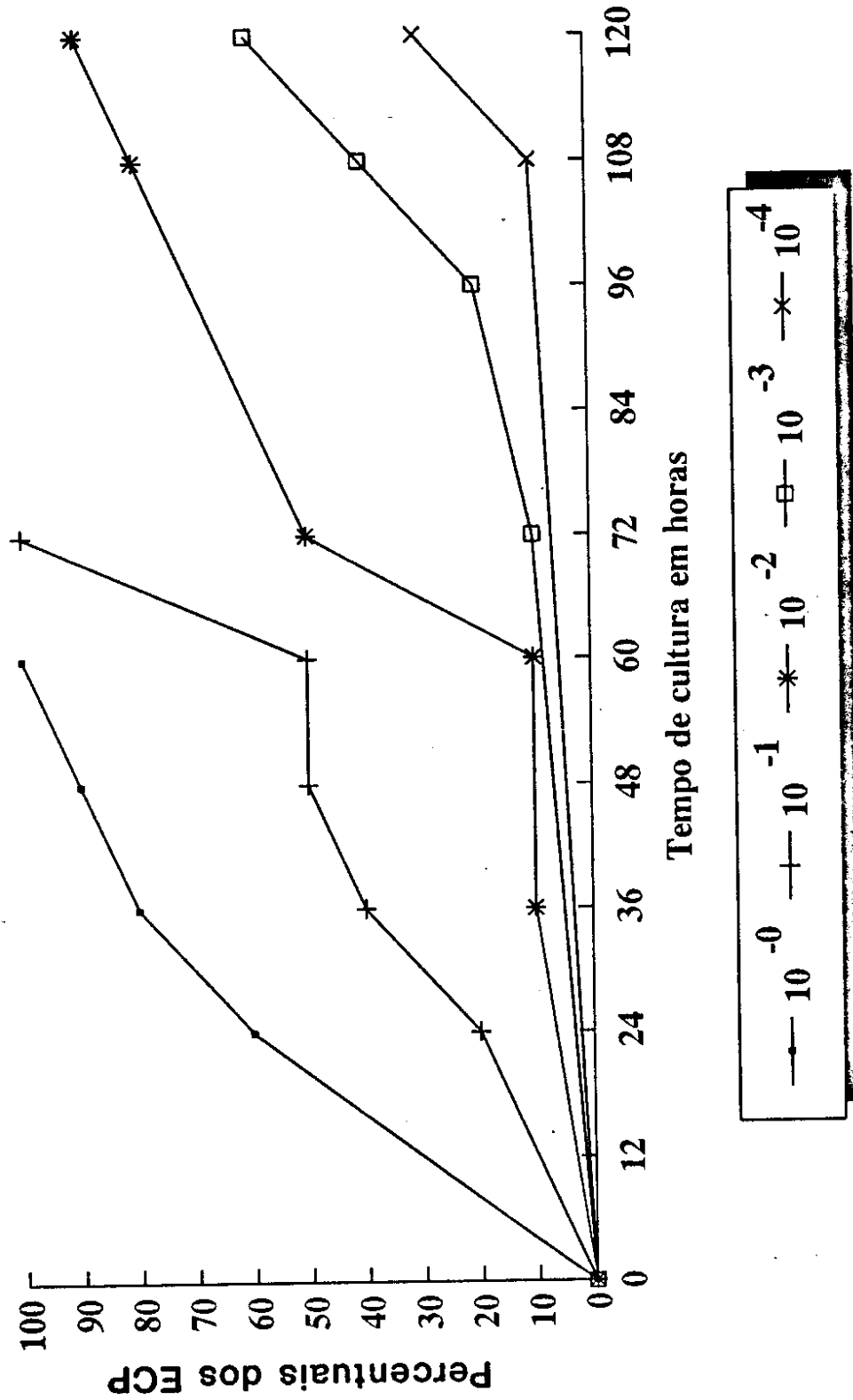
**GRÁFICO 1 - PERCENTUAIS DOS EFEITOS
CITOPÁTICOS MÁXIMOS DA AMOSTRA PVS-1
EM CÉLULAS ST (pré-experimento-2)**



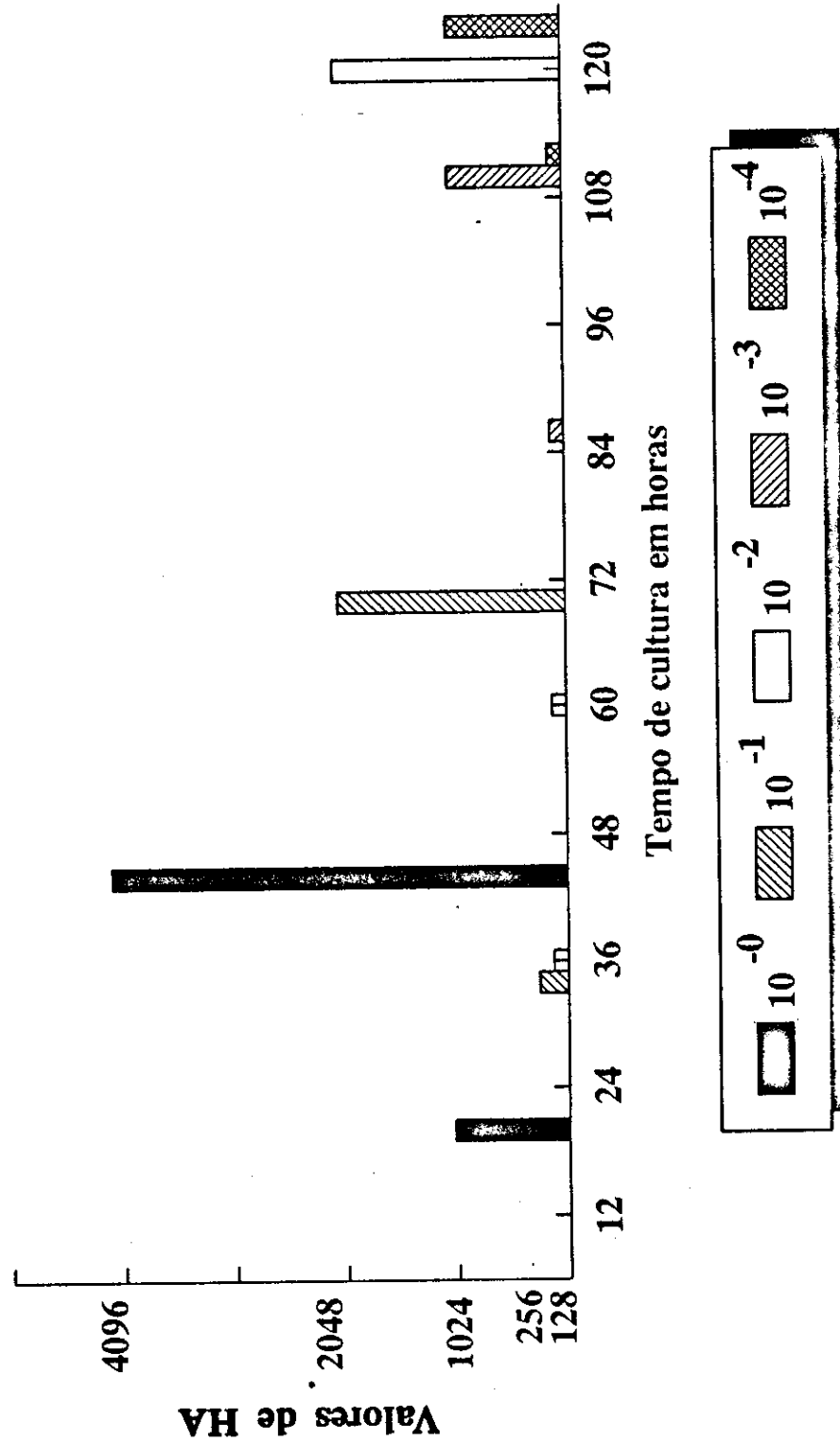
**GRÁFICO 2 - TÍTULOS HEMOAGLUTINANTES
MÁXIMOS DA AMOSTRA PVS-1 EM CÉLULAS
ST (pré-experimento-2)**



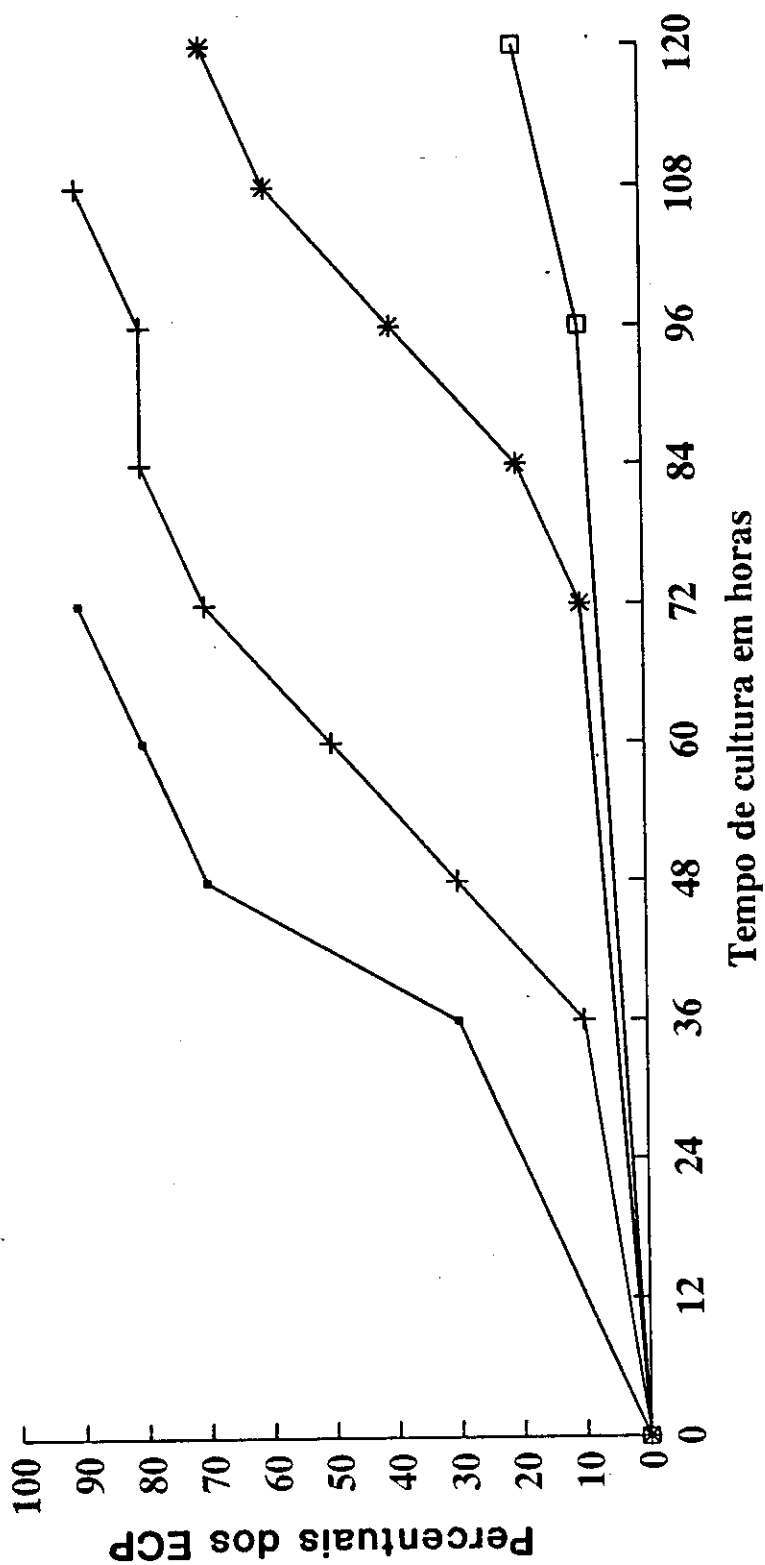
**GRÁFICO 3 - PERCENTUAIS DOS EFEITOS CITO
PÁTICOS MÁXIMOS DA AMOSTRA NADL-2 EM
CÉLULAS ST (pré-experimento 2)**



**GRÁFICO 4 - TÍTULOS HEMOAGLUTINANTES
MÁXIMOS DA AMOSTRA NADL-2 EM CÉLULAS
ST (pré-experimento-2)**

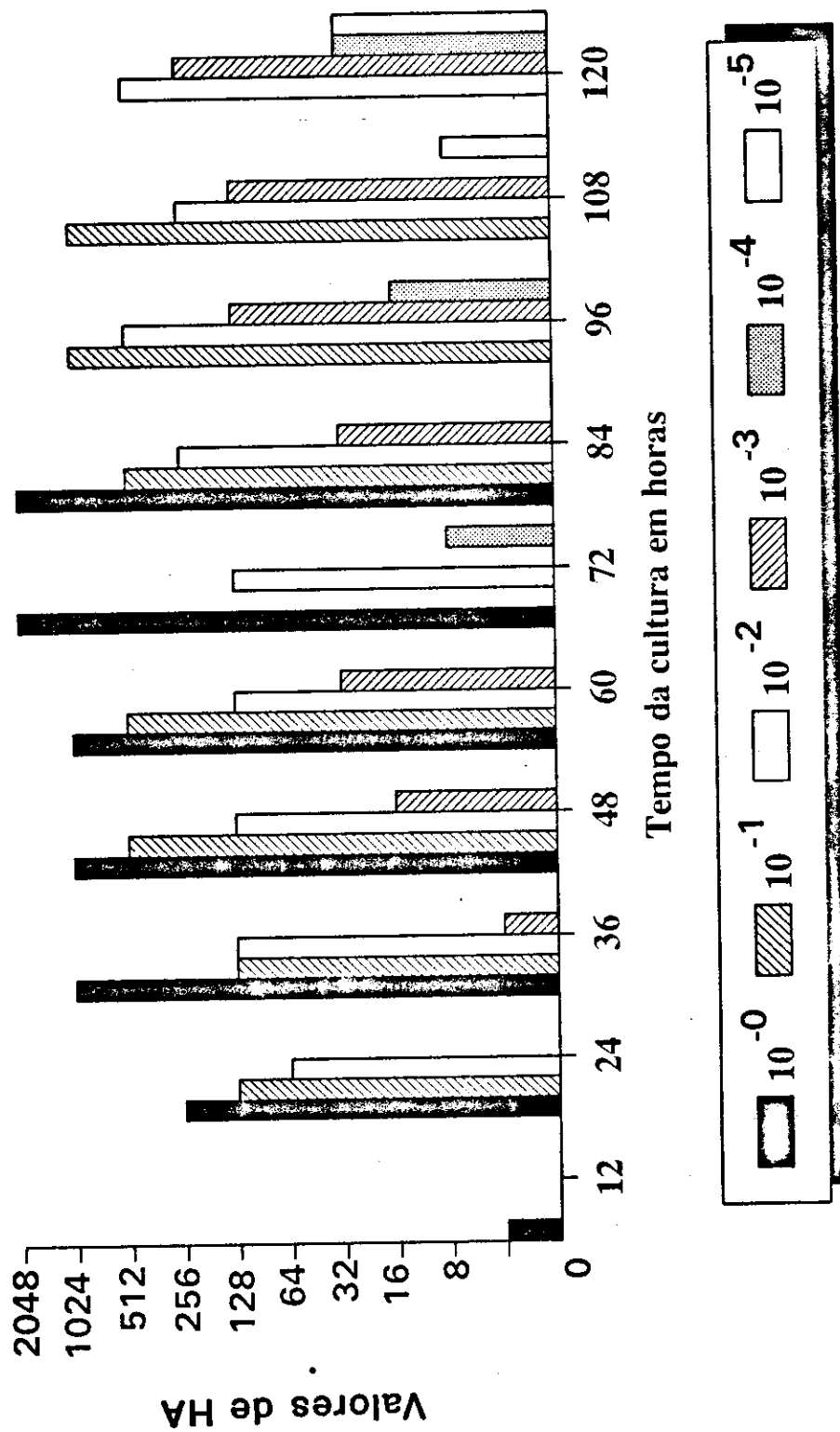


**GRÁFICO 5 - PERCENTUAIS DOS EFEITOS CITO
PÁTICOS MÁXIMOS DA AMOSTRA PVS-1 EM CÉLU
LAS ST (experimento final)**

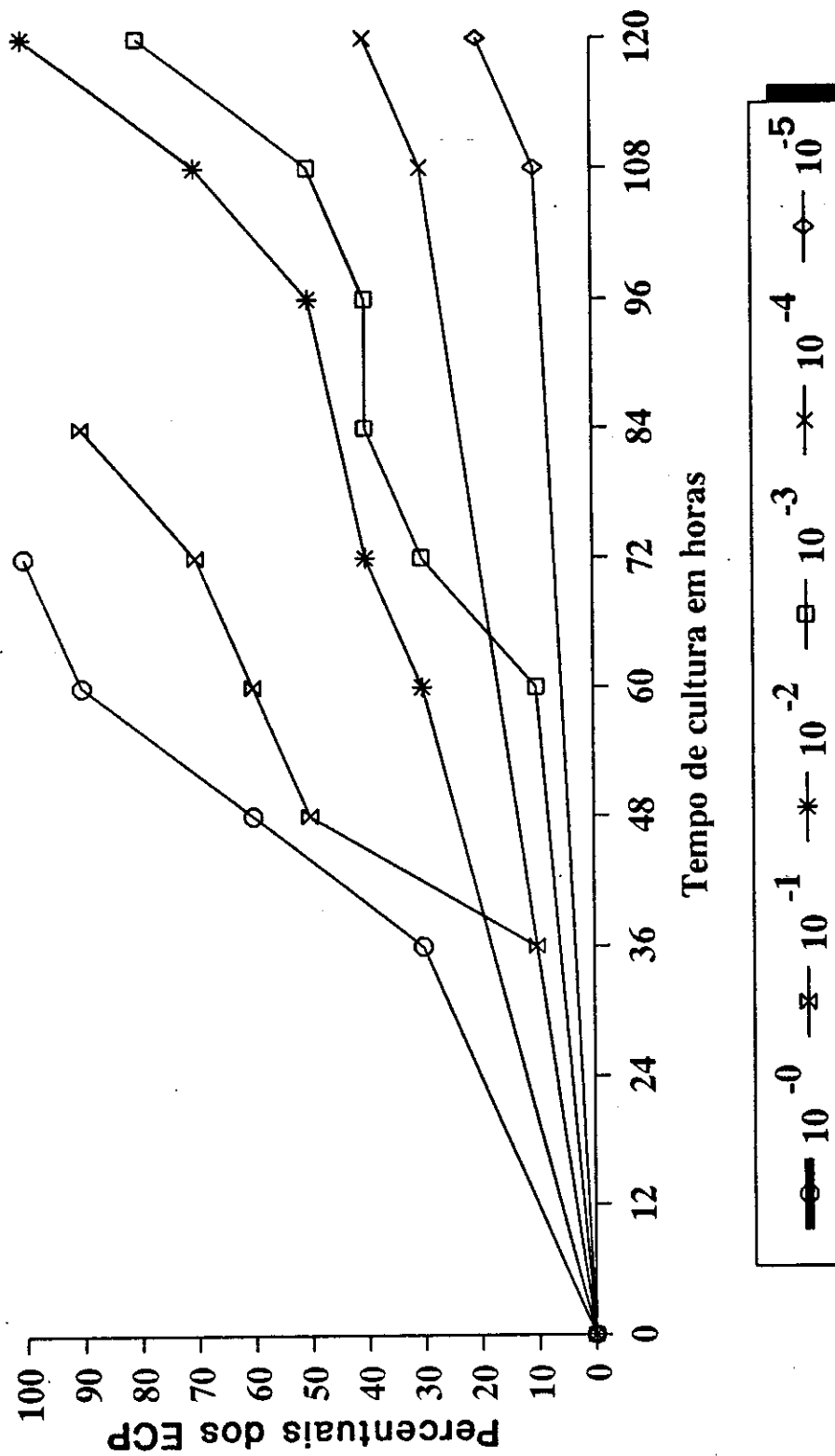


—●— 10^{-0} —+— 10^{-1} —*— 10^{-2} —□— 10^{-3}

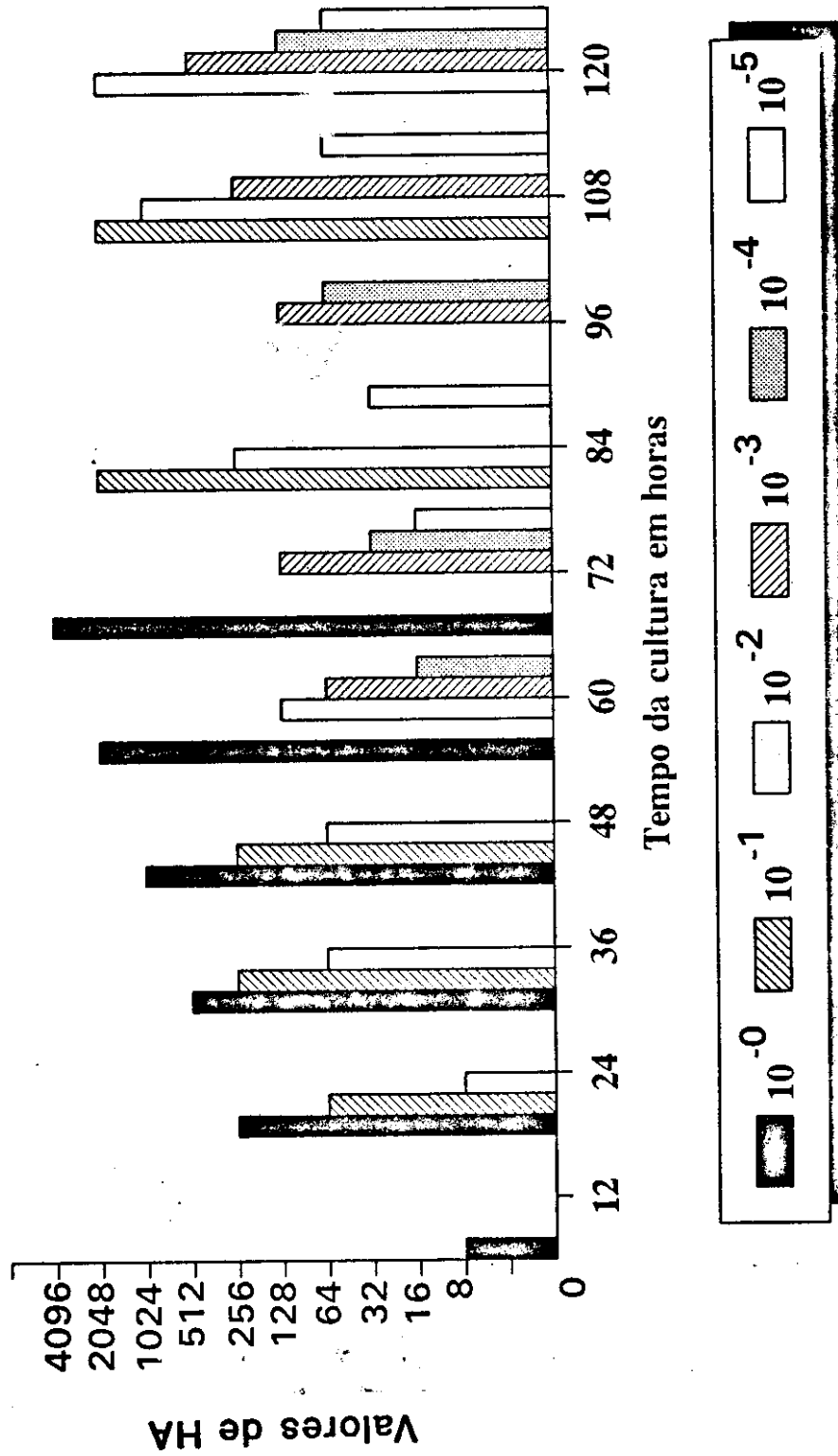
**GRÁFICO 6 - TÍTULOS HEMOAGLUTINANTES
MÁXIMOS DA AMOSTRA PVS-1 EM CÉLULAS
ST (experimento final)**



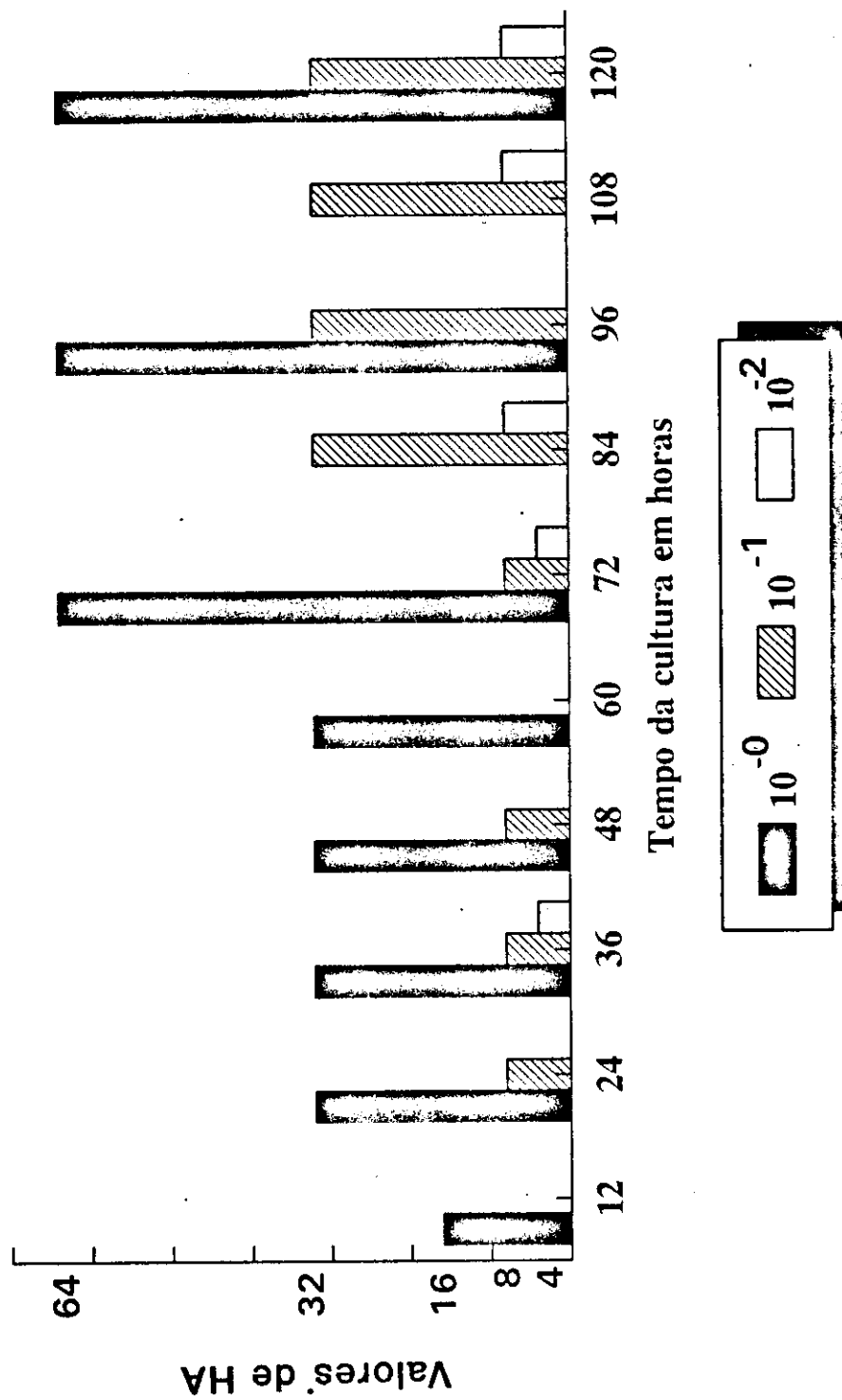
**GRÁFICO 7 - PERCENTUAIS DOS EFEITOS CITO
PÁTICOS MÁXIMOS DA AMOSTRA NADL-2 EM
CÉLULAS ST (experimento final)**



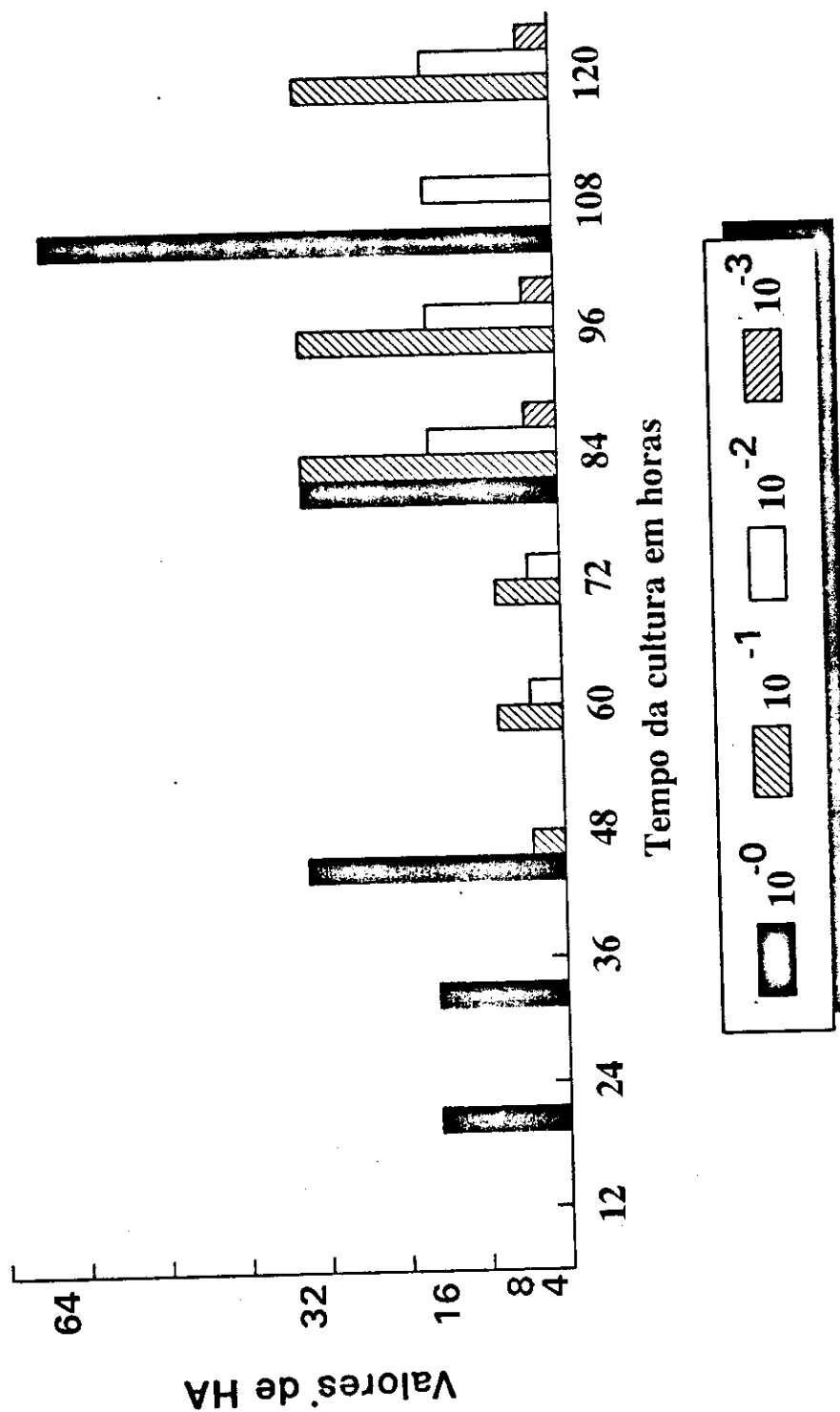
**GRÁFICO 8 - TÍTULOS HEMOAGLUTINANTES
MÁXIMOS DA AMOSTRA NADL-2 EM CÉLULAS
ST (experimento final)**



**GRÁFICO 9 - TÍTULOS HEMOAGLUTINANTES
MÁXIMOS DA AMOSTRA PVS-1 EM CÉLULAS
PK-15 (experimento final)**



**GRÁFICO 10 - TÍTULOS HEMOAGLUTINANTES
MÁXIMOS DA AMOSTRA NADL-2 EM CÉLULAS
PK-15 (experimento final)**



8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- 01 - BACHMANN, P. A. Porcine Parvovirus Infection "in vitro": a study model for the replication of parvoviruses. I. Replication at different temperatures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v.140, p. 1369-1374, 1972
- 02 - BACHMANN, P.A; DANNER; K. Porcine parvovirus infection in vitro: a study model for the replication of parvovirus. II. Kinetics of virus and antigen production. *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B.* v.23, n. 5/6, p.355-363, 1976.
- 03 - BERNS, K. I. Parvovirus replication. *Microbiol Rev.* v.54, n.3, p.316-329, 1990
- 04 - CARTWRIGHT, S.; HUCK, R. A. Viruses isolated in association with herd infertility, abortion and stillbirths in pigs. *Vet. Rec.* v.81, n.8, p.196-197, 1967
- 05 - CARTWRIGHT, S. F.; LUCAS M.; HUCK, R.A. A small haemagglutinating porcine DNA virus. *J. Comp. Pathol.* v.79. p.371-377, 1969
-

- 06 - CHOI, C. S.; MOLITOR, T. W.; JOO, H. S., Inhibition of porcine parvovirus replication by empty virus particles. *Arch. Virol* v.96, p.75-87, 1987.
- 07 - COTMORE, S. F.; TATTERSALL, P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* v.33, p.91-175, 1987.
- 08 - EDWARDS, K. R.; THORNTON, D. H. Tissue culture infectivity assay for porcine parvovirus. *Vet. Rec.* v.115, p.108, 1984.
- 09 - GOUVEIA, A. M. G. *Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores da hemoaglutinação para parvovírus suíno do Estado de Minas Gerais.* Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1982. 58 p. Tese (Mestrado).
- 10 - HARDING, M. J; MOLITOR, T. W. Porcine parvovirus: replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Arch. virol.* v.101, p.105-117, 1988
- 11 - JOO, H. S.; JOHNSON, R. N. Serological responses in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. *Aust. Vet. J.* v.53, n.11, p.550-552, 1977.
- 12 - JOO, H. S.; MOLITOR, T. W.; LEMAN, A. O. Antibody responses of guinea-pigs, rabbits and pigs to inactivated porcine parvovirus vaccines. *Vet. Microbiol.* v.09, n.1, p.27-33, 1984.

- 13 - JOO, H. S. Troubleshooting reproductive failure: mummies and stillbirths. In: AMERICAN ASSOCIATION OF SWINE PRACTITIONERS ANNUAL MEETING, 1992; Nashville. Nashville, AASP, 1992, p.19-20
- 14 - KAWAMURA, H.; FUJITA, T.; IMADA, T. Plaque formation and replication of porcine parvovirus in embryonic swine kidney cell line, ESK cells. *Jpn. J. Vet. Sci.* v.50, n.3., p.803-808, 1988.
- 15 - KRELL, P. J.; SALAST.; JOHNSON, R. P. Mapping of porcine parvovirus DNA and development of a diagnostic DNA PROBE. *Veterinary Microbiology* v.17, p.29-43, 1988.
- 16 - LOBATO, Z. I. P. *Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra o parvovírus suíno com uma vacina inativada experimental e pelo método de "feed back" (retro-infecção)*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1990. 90p. Tese (Mestrado).
- 17 - MARTINS, R. M.; ROGUE, P. M.; GUIMARÃES, L. G.; BANGEL, E. V.; GUIZZARO., I. I.; BRUCHIMAN, A. A.; VIDOR, T. In: CONGRESSO NACIONAL DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1, Curitiba, PR., 1984. Anais. p.19.
- 18 - MENGELING, W. L. & CUTLIP, R. C. Pathogenesis of in útero infection: Experimental infection of 5-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* v.36., p.1173-1177, 1975.

- 19 - MENGELING, W. L.; BROWN, T. T., PAUL, P.S., et al Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus induced reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.* v.40, p.204-207, 1979.
- 20 - MOLITOR, T. W.; JOO, H. S.; COLLETT, M. S. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J. Virol.* v.45, n.2, p.842-854, 1983.
- 21 - PYE, D.; BATES, J.; EDWARDS, S. J., et al. Development of a vaccine preventing parvovirus-induced reproductive failure in pigs. *Austr. Vet. J.* v.67, n.5, p.179-182, 1990.
- 22 - PAUL, P. S. & MENGELING, W. L. Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus induced reproductive disease in swine. *Am.J.Vet.Res.* v.41, n.12, p.2007-2011, 1980
- 23 - PEEV, Y. A.; MOTOVSKY, A; ALEKSANDRON, M. et al. Sensitivity of various cell cultures to porcine parvovirus. *Veterinarnomeditsinsky. Nauki* v.23, n.5, p.3-11 1986. In: *Vet Bul.* v.56, n.10, p.901, 1986.
- 24 - PERESTRELO, R. O papel do parvovirus nas alterações da reprodução da espécie porcina. *Rev. Port. Cien. Vet.* v.82, n.484, p.315-332, 1987.
- 25 - PIRTLE, E. C. Titration of two porcine respiratory viruses in mammalian cell cultures by direct fluorescent antibody staining. *Am. J. Vet. Res.* v.35, n.2, p.249-250, 1974.

- 26 - QUALITY control methods for cell lines. 1985. Rockville, Maryland. ATCC, 1985. p.78.
- 27 - RHODES III, SL. Defective interfering particles of parvovirus H-1. *J. Virol.* v.27, n.2, p.347-356, 1978.
- 28 - STEPANEK, J.; MACHATY, Y.; MENSK, J. Isolation of parvovirus from sows with disorders during pregnancy. *Vet. Med.* v.24, n.3, p. 149-158, 1979. In: *Vet Bull.* v.49, n.10, p.763, 1979.
- 29 - VANNIER, P.; BRUN, A.; GHAPPUIS, G., et al. Study of the efficacy of an inactivated virus vaccine against porcine parvovirus. *Ann, Rech. Vet.* n.17, n.4, p.425-432, 1980.
- 30 - WRATHALL, A. E.; WELL, D. E.; CARTWRIGHT, S.F., et al. An inactivated oil-emulsion vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Res. Vet. Sci.* v.36, p.136-143, 1984.
- 31 - WOSU, L.O. Optimal parameters for "in vitro" growth of parvovirus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* v.10, n.1, p. 25-32, 1987.