

Sérgio Luiz de Freitas Balsamão

**CORONAVÍRUS CANINO: FATORES LIMITANTES E PADRONIZAÇÃO
PARA MULTIPLICAÇÃO EM LINHAGENS CELULARES E ENSAIO
SOROLÓGICO.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Minas Gerais, como
requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.
Área: Preventiva
Orientador: Prof^a. Aurora
Maria Guimarães Gouveia

Belo Horizonte
UFMG- Escola de Veterinária
1994

B 196c Balsamão, Sérgio Luiz de Freitas, 1961 -
Coronavírus canino: fatores limitantes
e padronização para multiplicação em
linhagens celulares e ensaio sorológico/
Sérgio Luiz de Freitas Balsamão. - Belo
Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária,
1994.

52p. : il.

Dissertação (mestrado)

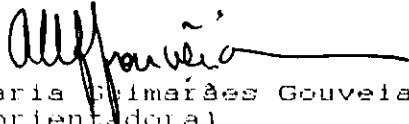
1. Cão - Doenças - Teses.

2. Coronavírus - Diagnóstico - Teses.

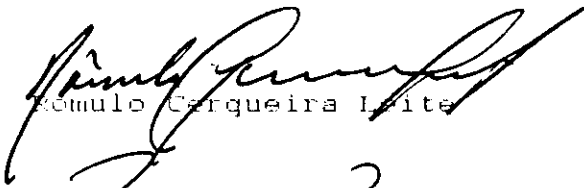
I. Título.

CDD 636 708 969 2

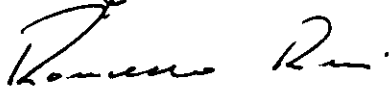
Dissertação defendida e aprovada em
27/05/1994, pela Comissão Examinadora
constituída por:



Aurora Maria Guimarães Gouveia
(orientadora)



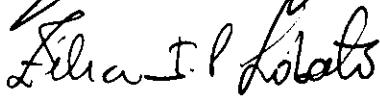
Romulo Carqueira Leite



Ronaldo Reis



Andrey Pereira Lima



Zélia Inês Fortela Lobato

Aos meus pais, Licínio e
Neusa, a minha tia
Terezinha, aos meus irmãos e
ao amigo Sérgio, dedico este
trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Aurora Maria Guimarães Gouveia pela orientação e compreensão.

Aos profs. Rômulo Cerqueira Leite e Ronaldo Reis pelas sugestões e estímulos.

Às professoras Celina Maria Modena e Vera Lucia Viegas por todo o incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

A todos os colegas de mestrado, especialmente ao amigo Andrey.

À Zélia Inês Portela Lobato pelos valiosos e encorajadores ensinamentos.

Aos funcionários do laboratório de virologia pela assistência, destacando a amiga Creuza de Carvalho Vicente pela grande dedicação e ajuda.

À Nádia pela prestimosa ajuda e paciência durante a digitação.

Aos funcionários da biblioteca, principalmente à Rosilene e Marília pela ajuda e estímulo.

Aos amigos Sérgio Bambirra e Raquel, pelo exemplo de luta e pela imensa amizade.

À Maria Cristina, por todo incentivo, carinho, conforto e amor nesta etapa final de trabalho.

À Fabiana, pela constante inspiração, na presença de anos e na ausência atual.

As colegas e amigas Fátima, Mirna, Ângela e Simone por toda a compreensão e ajuda, sempre tão valiosas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
6	CONCLUSÕES	46
7	SUMMARY.....	47
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1	40
TABELA 2	41
TABELA 3	42
TABELA 4	43

RESUMO

Foram estudadas três linhagens celulares contínuas, CRFK, MDCK e A-72 quanto a seus requerimentos nutricionais e de desenvolvimento, e quanto à sensibilidade ao coronavírus canino (CVC) amostra K-378-20. As melhores condições para o cultivo da linhagem A-72 foram utilizando o meio L15 GIBCO com 10% de soro fetal bovino (SFB) em concentrações iniciais de $3,0$ a $4,0 \times 10^4$ cél/cm² em garrafas plásticas descartáveis, com repiques semanais e troca de meio com 5% de SFB a cada dois dias de incubação. Concentrações iniciais de $7,0$ a $8,0 \times 10^4$ cél/cm² em L15 com 5% de SFB em estufa à 37°C sem atmosfera de CO₂ foram ótimas para a cultura em microplacas. Foi a mais sensível ao CVC, obtendo-se bons títulos (10^5 a 10^6 DICC₅₀/25µL) em menor tempo, porém foi a linhagem mais trabalhosa e instável, sendo utilizada para ativação e isolamentos iniciais. Para as linhagens CRFK e MDCK as melhores condições foram usando o MEM-EAGLE com aminoácidos não essenciais (NEAA) com 10% de SFB em concentrações iniciais de $2,0$ a $3,0 \times 10^4$ cél/cm² com repiques duas vezes por semana. Foram linhagens mais resistentes que a A-72, porém, menos sensíveis ao CVC, sendo que na MDCK não foi observado efeito citopático (ECP). Concentrações iniciais de $6,0$ a $7,0 \times 10^4$ cél/cm² foram as melhores para o cultivo de CRFK em microplacas, utilizando-se meio L15 com 5% de SFB em estufa à 37°C sem atmosfera de CO₂. Para a replicação de CVC amostra K-378-20 as melhores condições foram obtidas utilizando faixa de pH entre 5,0 e 7,0, tempo de adsorção de 90 minutos, com formação de 90% de ECP em três dias em A-72 e cinco dias em CRFK, foi obtido em média 10^5 DICC₅₀/25µl de título infectante com tempo ótimo de leitura de 72 a 96 horas pós-inoculação. Através do uso da técnica de imunodifusão em agar gel (IDAG) foi evidenciada a presença de 29 soros (19%) positivos para o CVC K-378-20, em amostra de 157 soros caninos coletados em Belo Horizonte, em período que antecedeu à comercialização de vacinas anti-CVC no país.

1. INTRODUÇÃO

A ocorrência de gastroenterites em cães é freqüente e suas causas são variáveis, podendo ser, dentre outras, de origem infecciosa viral.

Os vírus envolvidos na etiologia das gastroenterites de cães passaram a ser foco de atenção maior por parte de veterinários e pesquisadores na última década. CARMICHAEL & BINN (1981) citam que a grande ocorrência de infecções entéricas virais caninas vem suscitando progresso considerável na definição de seus aspectos clínicos e patológicos, e no desenvolvimento de testes de diagnóstico.

Um dos fatores limitantes no estudo e pesquisa das viroses caninas é a produção regular de massa viral antigênica em sistemas celulares controlados, bem como seu isolamento e identificação.

A partir de 1977 houve um interesse crescente no estudo das viroses gastrointestinais caninas, quando do isolamento do parvovírus canino (PVC) e suas implicações clínicas mundiais (EUGSTER, 1977).

No caso específico do PVC algumas linhagens celulares contínuas já foram descritas como sensíveis, porém sua atividade hemaglutinante facilitou sobremaneira a identificação, funcionando como bom sistema revelador.

Já vírus como o rotavírus canino (RVC) e o coronavírus canino (CVC) são geralmente exigentes em requerimentos para crescimento, e seu cultivo é, até o momento, limitado a inoculações em hospedeiros animais específicos ou em células e tecidos derivados destes hospedeiros (APPEL et al., 1979; BINN et al., 1980; EVERMANN et al., 1989). Considerando que estes agentes são revelados através de efeitos citopáticos (ECP) em cultura de células e imunofluorescência, torna-se necessária uma boa produção de massa antigênica e uma

linhagem contínua celular estável (CARMICHAEL & BINN, 1981).

Visando a produção de massa viral regular e constante para obtenção de imunógenos e testes de diagnósticos, o presente trabalho objetivou estudar os fatores limitantes no crescimento e manutenção de três linhagens celulares contínuas sensíveis ao PVC e CVC, sendo duas de origem canina (A-72 e MDCK) e uma de origem felina (CRFK), bem como determinar as condições ótimas para padronização do teste de soroneutralização em microplacas (SN) para o CVC.

Justificando-se na necessidade de informações sobre o perfil sorológico da coronavirose em cães antes do advento das vacinas comerciais contra esta doença no Brasil, a presença de anticorpos anti-CVC foi pesquisada utilizando a técnica de imuno-difusão em agar-gel (IDAG).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINHAGENS CELULARES SENSÍVEIS AO CORONAVÍRUS CANINO.

BINN et al. (1974) em estudos de isolamento de CVC, verificaram a sensibilidade das linhagens celulares de cultura primária de rim de cão (PDK), timo canino (TC), "german shepherd embryo" (GSE), "canine synovium" (DEN), "walter reed canine" (WR), cultura primária de rim felino, suíno, bovino, macaco resus, PK-15, células de pulmão de embrião humano (WI-38) e células VERO. As células PDK, TC, DEN e GSE, foram consideradas sensíveis ao crescimento viral e as demais resistentes.

APPEL et al. (1979) isolaram sete amostras de CVC em PDK, mas notaram variações no aparecimento de ECP de acordo com a amostra e o lote de células usadas. Os ECP mais pronunciados ocorreram quando utilizaram linhagens contínuas caninas. Neste trabalho foi observada ausência de hemaglutinação do CVC, usando diferentes condições de teste e eritrócitos de várias espécies.

BINN et al. (1980) trabalharam no estabelecimento e caracterização de uma linhagem contínua (A-72), canina de origem tumoral, justificando que os estudos de isolamento e sorologia de doenças virais caninas são muito limitados, levando-se em conta que a preparação de culturas primárias é onerosa, consome-se muito tempo sendo as mesmas variáveis em termos de sensibilidade aos vírus. A A-72 foi considerada estável, tendo sido feitas mais de 135 passagens seriadas. São células densidade-dependentes e mantém inibição por contato de células em divisão. A A-72 foi considerada sensível aos adenovírus tipo I e II, herpesvírus canino, parainfluenza canina e ao CVC. Quanto ao "minute virus" canino (PVC-1) e a cinomose, as células foram consideradas resistentes.

CARMICHAEL & BINN (1981) citam que CVC produz ECP em várias culturas primárias e contínuas de células de cães, mais especificamente em PDK, TC, DEN e A-72. Existem variações de sensibilidade entre lotes de culturas de PDK. As células A-72 foram consideradas as mais consistentes na resposta à infecção. Células felinas como a CRFK e células de fibroblasto de embrião felino são também sensíveis ao CVC. As culturas infectadas desenvolveram ECP usualmente no segundo dia pós-inoculação (p.i.).

TINGPALAPONG et al. (1982) trabalharam com as linhagens A-72, CRFK, PDK e WR, obtendo o isolamento de CVC apenas em A-72.

WOODS (1982) trabalhou com células de feto felino (FC) e com A-72, sendo ambas consideradas sensíveis.

YASOSHIMA et al. (1983) utilizaram com sucesso culturas primárias (PDK) e secundárias (PK-2) de rim canino e a linhagem CRFK para isolamento e caracterização de CVC.

KOJIMA et al. (1986) fizeram um estudo detalhado da multiplicação do CVC em CRFK, encontrando a formação de sincícios como a forma mais pronunciada de ECP quando se inoculou 1 DICC₅₀/cél. Com 50 DICC₅₀/cél ocorreu arredondamento e descolamento da camada celular. Os autores consideraram a CRFK como uma boa linhagem de trabalho para estudos do CVC.

WILSON et al. (1986) trabalhando com prováveis efeitos colaterais de vacinas comerciais associadas de PVC e CVC, utilizaram a linhagem celular MDCK como substrato de formação de ECP.

MOCHIZUK et al. (1987) concluíram que é oportuno manter uma linhagem contínua como a CRFK, A-72 ou células de embrião felino (FC) como células indicadoras da presença de CVC.

APPEL (1988) utilizando o CVC 1-71, fizeram replicação com seis passagens em PDK e logo após usou a CRFK como célula de trabalho, bem como o isolamento do vírus através de CRFK.

EVERMANN et al. (1989) citam que o CVC é altamente exigente em requerimentos para crescimento e limitado a inoculações em hospedeiros vivos ou em culturas primárias oriundas destes hospedeiros. O isolamento de vírus entéricos é limitado, pois na maioria das vezes, estes agentes necessitam de enzimas do hospedeiro para sua ativação completa ou não.

LAMARRE & TALBOT (1989) estudando o efeito da temperatura e pH em coronavírus humano, demonstraram que a infectividade foi máxima em pH 6,0 quando incubado de 4 a 33°C, sendo mais pronunciado o efeito do pH quando incubado a 33°C. O vírus perde completamente a infectividade quando incubado a 22, 33 ou 37°C por 14 dias, mas permanece relativamente constante a 4°C pelo mesmo período de tempo. Concluíram também que a infectividade não é afetada mesmo após 25 ciclos de congelamento e descongelamento.

TENNANT et al. (1991, 1993) utilizaram a linhagem A-72 para estudos de isolamento, sorologia e patogenia do CVC, obtendo resultados positivos.

2.2 ESTUDOS DE PREVALÊNCIA

Os vírus da família *Coronaviridae* são partículas pleomórficas, com diâmetro variando entre 60 a 180 nm. Contém genoma RNA fita simples e envelope lipídico do qual emergem projeções de aproximadamente 20 nm de comprimento. Os vírus desta família são menos resistentes a influências físicas e químicas que os parvovírus (STURMAN & HOLMES, 1983).

HELPER-BAKER et al. (1980) estudaram a incidência de viroses entéricas caninas utilizando a imunofluorescência indireta, encontrando 14,8% de positivos para o CVC em cães domiciliares, 22,2% de positivos para o PVC e 7,4% de positivos para ambas viroses.

TOMA & MORAILLON (1980) estudaram 417 soros de cães da região de Paris, encontrando 75% de positivos para o CVC, através de soroneutralização.

Mais recentemente foi descrito em São Paulo um surto de gastroenterite hemorrágica em criatório de cães da raça Pastor Alemão e seus contactantes. A microscopia eletrônica de amostras fecais revelou presença de partículas virais caracterizadas morfológicamente como coronavírus (HAGIWARA et al, 1989).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MÉTODOS GERAIS DE CULTIVO CELULAR

3.1.1 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas as linhagens contínuas CRANDELL FELINE KIDNEY (CRFK) de origem felina, MADDEN-DARBY CANINE KIDNEY (MDCK) e A-72, ambas de origem canina.¹

3.1.2 MEIO DE CULTURA

Para crescimento das células foi utilizado o meio de cultura indicado para cada linhagem, acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e antibióticos (200 UI de penicilina G-Potássica, 200 µg de sulfato de estreptomicina por ml).

O meio de manutenção foi idêntico ao de crescimento, exceto por conter de 2 a 5% de SFB (YASOSHIMA et al. , 1983; HELFER-BAKER et al. , 1980).

Foram utilizados meios comerciais L15 para a A-72 e MEM-EAGLE-NEAA para as MDCK e CRFK, das marcas GIBCO e SIGMA².

3.1.3 REPIQUES CELULARES

¹ Oriundas do banco de células da Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG) e do American Type Culture Collection (ATCC), cedidas pelo laboratório Lema Biologic do Brasil.

² SIGMA CHEMICAL COMPANY
P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA.
GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES Inc.
P.O. Box 9418, Gaithersburg, MD 20898, USA.

3.1.3 REPIQUES CELULARES

As monocamadas celulares foram lavados com solução salina fosfatada (PBS) pH 7,2 e incubados a 37°C com solução de tripsina-EDTA (STV) a 0,05% por dois a cinco minutos. A suspensão assim obtida, foi centrifugada a 85 x g por cinco minutos sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido com meio para crescimento e distribuído em garrafas plásticas de 25 cm², após ajuste da concentração celular. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C até que a monocamada estivesse completa. As linhagens, após padronização, foram congeladas em diferentes passagens para posterior uso, utilizando-se 20% SFB e 10% de DMSO, em nitrogênio líquido.

3.2 PADRONIZAÇÕES CELULARES

3.2.1 MEIO DE CULTURA IDEAL

Para determinar parâmetros de crescimento e integridade celular, cada linhagem foi submetida a dois tipos de meios comerciais e duas marcas distintas, em quatro condições diferentes de teste (L15 GIBCO, L15 SIGMA, MEM-EAGLE-NEAA GIBCO e MEM-EAGLE-NEAA SIGMA).

Foram mantidas as concentrações de 10% de SFB para crescimento e 5% para manutenção.

Cada linhagem celular foi tripsinizada, padronizada em $3,0 \times 10^4$ cél/cm² iniciais e distribuída em garrafas plásticas de 25 cm², sendo três garrafas por meio estudado, em um total de doze garrafas por linhagem.

Tempo de confluência completa da monocamada, desenvolvimento e morfologia celular, e presença de efeito tóxico foram determinados pela observação diária das culturas. Ao final de cinco dias, as células foram novamente tripsinizadas, contadas e padronizadas em $3,0 \times 10^4$ cél/cm² iniciais, distribuídas em garrafas plásticas de 25 cm²,

totalizando quatro passagens consecutivas de cada linhagem por meio estudado.

3.2.2 SORO FETAL BOVINO - SFB

Foram testados quatro marcas de SFB (FUNED n° 6, Cultilab n° 1079, EV-UFMG n° 001 e Nutricell n° 29592) em quatro concentrações diferentes (5, 10, 15 e 20%).

Para este estudo o meio de cultura foi mantido constante, sendo L15 GIBCO para A-72 e MEM-EAGLE-NEAA GIBCO para as CRFK e MDCK. As células foram padronizadas em $3,0 \times 10^4$ cél/cm² iniciais. A cada cinco dias as culturas foram repicadas e observadas quanto ao comportamento do crescimento celular e presença de efeitos tóxicos, totalizando quatro passagens consecutivas.

3.2.3 INTERVALO ENTRE REPIQUES

As linhagens celulares foram submetidas a dois intervalos distintos entre passagens: uma vez por semana com troca de meio a cada dois dias e duas vezes por semana, sem troca de meio. Por observação diária das monocamadas, foram considerados o tempo de confluência total, melhor formação da camada celular e presença ou não de efeitos tóxicos.

Os meios de cultura foram mantidos fixos para cada linhagem, sendo L15 GIBCO para a A-72 e MEM-EAGLE-NEAA para as MDCK e CRFK, com 10% de SFB e concentração inicial de $3,0 \times 10^4$ cél/cm².

3.2.4 TIPOS DE GARRAFAS DE CULTIVO CELULAR

A sensibilidade e adaptação celular ao vidro e ao plástico descartável foram observados neste experimento.

Garrafas de vidro tipo xarope (A-100) e garrafas plásticas de 25 cm², receberam as linhagens celulares em uma concentração inicial de $3,0 \times 10^4$ cél/cm², mantidos o meio de cultura (L15 GIBCO para a A-72 e MEM-EAGLE-NEAA para as MDCK e CRFK), o SFB em 10% e

quatro repiques consecutivos com observação diária do comportamento celular em cada material.

3.2.5 CONCENTRAÇÃO CELULAR

Cada cultura celular foi testada em concentrações iniciais de 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 x 10⁴ cél/cm² e distribuídas em garrafas plásticas de 75 cm².

Foram mantidas as mesmas condições de meio, SFB e tempo de incubação para as linhagens. Utilizou-se cinco repetições, com três garrafas por linhagem e por cada concentração celular.

3.2.6 CARIÓTIPO

Para verificação do padrão cromossômico das linhagens celulares, a cariotipagem foi efetuada no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da EV-UFMG.

3.2.7 PESQUISA DE CONTAMINANTES

Durante todo o desenvolvimento do trabalho, as culturas foram monitoradas quanto a eventual presença de contaminantes bacterianos ou fúngicos, através de métodos convencionais em meios de cultura para germes aeróbios, anaeróbios e fungos, com incubação a 37°C e em temperatura ambiente, por, no mínimo 14 dias.

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AO CVC

3.3.1 VÍRUS

Foi utilizada amostra padrão de CVC K-378-20 ³, estocadas a - 70°C.

³ Cedido pelo Dr. B. TOMA (École de Vétérinaire, Maison Alfort, France)

3.3.2 INFECÇÃO DAS CÉLULAS

Para a produção de semente de vírus, garrafas de cultivo celular tipo Roux, com monocamada completa de A-72, foram lavadas com PBS e inoculadas com cinco mililitros da diluição 1:10 da amostra padrão de CVC. Após um período de adsorção de 90 minutos a 37°C, foi adicionado meio de manutenção e as garrafas incubadas em estufa a 37°C, sendo observadas diariamente quanto à presença de ECP.

Após três ciclos de congelamento e descongelamento e subsequente centrifugação a 3000 x g por 15 minutos, a suspensão viral foi titulada em A-72 e estocada a -70°C.

As linhagens em estudo, também foram infectadas pelo mesmo procedimento, porém em garrafas plásticas de 25 cm².

Amostra de CVC K-378-20 com título de 10³ DICC₅₀/25 µl, foi utilizada como semente e seguiu-se com quatro garrafas por tipo de linhagem celular e com cinco passagens consecutivas.

Todas as titulações foram feitas utilizando a linhagem A-72.

3.3.3 TITULAÇÃO DO VÍRUS

As titulações foram feitas em microplacas de 96 orifícios, contendo 25 µl de meio L15 GIBCO. Diluições decimais de CVC em meio L15 foram inoculadas em quadruplicata no volume de 25 µl por orifício. A seguir foram adicionados 25 µl de suspensão de células A-72 contendo 8,0 x 10⁴ cél/cm² em meio L15 com 5% de SFB. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por sete dias (YASOSHIMA et al., 1983; APPEL, 1988). O ponto final foi determinado pelo aparecimento de ECP e o título foi expresso como dose média infectante por 25 µl (DICC₅₀/25 µl) (REED & MUENCH, 1938).

3.4 PADRONIZAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS PARA O CULTIVO EM MICROPLACAS

3.4.1 CONCENTRAÇÃO CELULAR POR MICROPLACA

As células A-72 e CRFK foram submetidas a seis concentrações iniciais de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 x 10⁴ cél/cm² e distribuídas em microplacas de fundo reto de 0,32 cm²/orifício, em volume de 25 µl por orifício, sendo 12 orifícios por diluição. Foram adicionados 50 µl de meio L15 com 5% de SFB seguido de incubação a 37°C em estufa por sete dias.

Foram utilizadas quatro microplacas por linhagem celular estudada. As placas foram monitoradas diariamente quanto ao tempo de completa confluência celular, qualidade das células e estabilidade por sete dias.

3.4.2 MEIO DE CULTURA E PROCEDIMENTO DE INCUBAÇÃO

Os meios L15 e MEM-EAGLE-NEAA GIBCO, bem como o uso ou não de atmosfera de CO₂, foram testados em quatro microplacas por linhagem de A-72 e CRFK.

As células foram inoculadas em um volume de 25 µl por orifício e 50 µl de meio acrescentados a cada orifício.

Duas placas com L15 e duas com MEM-EAGLE-NEAA foram incubadas respectivamente em estufas com 5% de CO₂ e em estufa sem atmosfera de CO₂.

3.5 TESTE SOROLÓGICO INICIAL POR IMUNODIFUSÃO EM AGAR GEL (IDAG)

3.5.1 COLETA DE AMOSTRAS

As 157 amostras de soro foram obtidas a partir de sangue canino colhidos aleatoriamente em clínicas

veterinárias de Belo Horizonte, nos anos de 1992 e 1993, em período que antecedeu à oficialização e comercialização das vacinas anti-CVC no Brasil.

Foram anotadas as informações referentes a raça, idade, vacinações, diagnóstico clínico e bairro de origem do animal.

Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos e estocados a - 70°C até o momento do teste.

3.5.2 ANTÍGENO

A amostra de CVC K-378-20 na 5ª passagem em A-72 e com título infectante de 10^5 DICC₅₀/25 µl foi utilizada como antígeno padrão.

3.5.3 SORO PADRÃO

Como controle positivo, o soro hiperimune produzido em coelho na EV-UFMG a partir da amostra CVC K-378-20, foi utilizado como padrão.

3.5.4 AGAR

Foram testados dois tipos de agar (agar noble 0,9% e agarose 1%) distribuídos em lâminas microscópicas de 26 x 76 mm, desengorduradas em solução de álcool/éter 50% (v/v). O agar foi dissolvido em PBS pH 7,2 e distribuído em camada de 4,5 ml sobre cada lâmina. Após solidificação do agar por 24 horas, foram feitos sete orifícios com perfurador de diâmetro de 4 mm e distância entre furos de 3 mm). A retirada do agar de cada orifício foi efetuada com bomba de sucção, e os antígenos e soros foram distribuídos com micropipeta e ponteiros descartáveis. O orifício central recebeu o antígeno, nos orifícios acima e abaixo deste foi colocado o soro padrão positivo, e os quatro restantes receberam os soros a serem testados.

As lâminas foram mantidas em câmara úmida a 22/25°C. A leitura foi realizada com luz indireta sobre fundo escuro com 24 a 72 horas, sendo considerados positivos os soros que apresentaram linha

de identidade com o soro padrão positivo (NAKAJIMA & USHIMI, 1971).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÕES CELULARES

A linhagem CRFK mostrou-se crítica no pós-descongelamento, exigindo trocas de meio até que a monocamada se formasse, o que ocorreu entre 48 a 72 horas pós-descongelamento. Após este período, as culturas se tornaram mais estáveis, com boa uniformidade morfológica e de crescimento, suportando repiques na proporção de até 1:8 após padronizada. O tempo de confluência total foi de até 48 horas, sendo a linhagem de maior rendimento.

Quanto à tripsinização, a CRFK individualizou-se rapidamente, desprendendo-se do substrato celular em 2 a 3 minutos de contato com a tripsina. Em intervalos de repiques maiores que sete dias, ocorreu aumento no tempo de tripsinização em até 10 minutos e a individualização celular se tornou deficiente, com grande formação de grumos.

A linhagem MDCK foi a mais resistente aceitando repiques na proporção de até 1:6. Apresentou crescimento diferenciado, com formação de "ilhas celulares" antes do fechamento da camada celular. Após a padronização, mostrou ser a mais estável das três linhagens estudadas, porém, a mais laboriosa, sendo o tempo de tripsinização muito extenso (10-20 minutos), exigindo assim, trocas ou maior quantidade de tripsina durante os repiques. Apresentou confluência total após 48 horas, dependendo da concentração inicial de células, e normalmente continha muitas células em suspensão.

As culturas de A-72 foram as que apresentaram maiores dificuldades em todas as fases de cultivo, apresentando efeitos tóxicos por causas variadas e perda de células frequentes, exigindo com isto, grande número de congelações para reposição. A medida que o número de passagens aumentou, as células foram

diminuindo concentração, apresentando efeitos tóxicos ou aumentando gradativa e significativamente o tempo de tripsinização até que ocorreu a morte das células. Mostraram-se células completamente instáveis, com confluência total de 24 a 72 horas e aceitando repiques na proporção de 1:2 a 1:4.

4.2 MEIOS DE CULTURA

Dos meios de cultura analisados, os da marca SIGMA apresentaram rendimento bem inferior ao da marca GIBCO, sendo que com a A-72 o uso do meio SIGMA acelerou o aparecimento do processo tóxico.

Já entre os tipos de meios, o L15 mostrou-se o mais eficiente por ser o mais rico em constituintes. O meio MEM-EAGLE-NEAA mostrou ser muito eficiente para as linhagens CRFK e MDCK, sendo o de escolha, pelo menor custo em relação ao L15 que está em conformidade com a orientação do ATCC. Já a A-72 exige um meio mais rico, sendo a escolha neste caso pelo L15, o que também está em concordância com o ATCC e BINN et al. (1980).

4.3 SORO FETAL BOVINO

Analisando os lotes de SFB quanto à promoção de crescimento celular e à presença ou não de toxicidade para as culturas, os resultados foram muito semelhantes, tendo como melhor rendimento o SFB "FUNED" n°6 e como pior rendimento o SFB "Cultilab" lote n° 1079, que quando utilizado nas células A-72 mostrou fraco resultado em termos de promoção de crescimento e acelerou sobremaneira o processo tóxico.

Quanto à concentração de SFB no meio de crescimento, encontramos efeitos indesejáveis, como acidificação do meio, formação de grumos celulares e formação de sobrecamada, quando utilizamos o soro a 15 e 20%. Os melhores resultados foram:

a. A-72 - 20% de SFB no descongelamento, 10% para crescimento e 5% para manutenção.

b. CRFK e MDCK - 10% de SFB tanto para descongelamento quanto para crescimento e 5% para manutenção.

Estes resultados estão de acordo com a maioria dos autores que trabalham com estas linhagens e com as indicações do ATCC.

Quando baixamos a concentração de SFB de 10 para 5% na fase de crescimento da A-72, a concentração celular final foi gradativamente diminuindo a cada passagem, até a perda total das células.

4.4 INTERVALO ENTRE REPIQUES

Para a linhagem A-72 o melhor resultado foi com repiques semanais e troca de meio de dois em dois dias, encontrando a cada passagem uma média de $1,5 \times 10^5$ cél/cm². Já com dois repiques semanais, as células perderam concentração e ficaram mais frágeis. As garrafas que sofreram troca de meio e as controle (sem troca de meio) apresentaram, de qualquer maneira, efeito tóxico.

Para as linhagens CRFK e MDCK, dois repiques semanais foram eficientes, tendo um maior rendimento e células com características gerais bem melhores que quando repicadas uma vez por semana. Nas CRFK as passagens intervaladas em sete dias ou mais, dificultaram a tripsinização com aumento do tempo de exposição à tripsina e aumentando a formação de grumos celulares.

4.5 TIPOS DE GARRAFAS DE CULTIVO

As três linhagens desenvolveram-se melhor quando foram usadas garrafas plásticas descartáveis. CRFK e MDCK cresceram e se adaptaram muito bem em garrafas de vidro, não tendo sido encontrado nenhuma contra-indicação para o seu uso. No entanto, para as A-72 a adaptação ao vidro foi crítica, apesar de que em garrafas tipo ROLLER seu desenvolvimento foi satisfatório.

4.6 CONCENTRAÇÃO CELULAR

As melhores concentrações iniciais de repique celular para a linhagem A-72 foram de 3,0 a 4,0 x 10⁴ cél/cm².

Quando aumentamos muito a concentração inicial de células (7,0 a 8,0 x 10⁴ cél/cm²) ocorreu a formação de grumos e a presença de muitas células em suspensão, com perda da camada celular em 72 horas. Ao contrário, em baixas concentrações iniciais, observou-se baixo crescimento, com morte das células e alcalinização do meio de cultura.

BINN et al. (1980) trabalhando no estabelecimento desta linhagem, citam que as células são densidade-dependentes, mantêm inibição por contato e crescem no máximo a 2,5 x 10⁵ cél/cm² e as subculturas confluem totalmente em seis a oito dias após um repique de 1:3.

Mesmo após terem sido efetuados todos os testes e utilizados todos os melhores resultados, seguindo as orientações do ATCC e do Dr. Binn⁴ (comunicação pessoal), as células continuaram a apresentar um cultivo crítico, necessitando de cuidados diários e apresentando constantemente efeitos semelhantes a toxicidade e diminuição da concentração, geralmente em torno da sexta e sétima passagens consecutivas. Disto resultou uma dificuldade acentuada em manter esta linhagem em número e tempo suficientes para a padronização e realização dos testes de micro soroneutralização (SN) e isolamento de vírus.

⁴ BINN, L. N. PhD from the Division of Veterinary Medicine, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC 20012.

A despeito deste achado, BINN et al. (1980) descrevem a passagem seriada por mais de 135 vezes, com manutenção de todas as características da linhagem, tanto morfológicamente, como em requerimento de manutenção.

Com concentração inicial de $3,0 \times 10^4$ cél/cm², conseguiu-se uma média de $1,5 \times 10^5$ cél/cm² com média de cinco a sete dias entre repiques e com 90% de confluência celular em 24 horas em garrafas plásticas de 25 cm².

Concentrações de $2,0$ a $3,0 \times 10^4$ cél/cm² revelaram ser ideais tanto para a CRFK quanto para a MDCK, com confluência total em torno de 48 a 72 horas, boa formação de camadas e células com morfologia bem definida.

Na linhagem MDCK foi verificado grande número de células em suspensão, o que mostrou ser uma característica marcante nesta cultura. Este grande número de células em suspensão limitou a observação microscópica das células aderidas na parede das garrafas.

Nestas linhagens, o aumento ou diminuição da concentração inicial de células por garrafas, não influiu negativamente em suas características, apenas aumentou ou reduziu o tempo de confluência total e conseqüentemente, aumentou ou diminuiu o período entre repiques.

4.7 CARIÓTIPO

As três linhagens celulares mantiveram-se dentro do seu padrão cromossômico (A-72 $2n= 92/93$, MDCK $2n= 78$, CRFK $2n= 38$) durante o experimento, confirmando a ausência de contaminações por outras linhagens celulares.

4.8 CONTROLE DE CONTAMINANTES

As amostras celulares mantiveram-se livres de contaminantes bacterianos e fúngicos durante todos os testes.

4.9 TESTE DE SENSIBILIDADE AO CVC

A linhagem A-72 mostrou-se a mais sensível, obtendo-se os melhores títulos em menor tempo, chegando a 10^6 DICC₅₀/25 μ l na quinta passagem consecutiva, com 72 horas de incubação. A presença de ECP foi característica constante a partir de 48 horas p.i., manifestando-se como arredondamento e descamação de células da monocamada até a completa lise e destruição do monocamada, o que ocorreu em 72 a 96 horas p.i. Este achado está de acordo com CARMICHAEL & BINN (1981) que concluem ser a A-72 a mais consistente na resposta à infecção por CVC.

BINN et al. (1980) trabalhando na caracterização e estabelecimento da A-72, recomendaram que estas células tenham particular uso nos estudos dos coronavírus, de difícil cultivo, que comumente são replicados em cultivos primários de rim canino. Já TENNANT et al. (1991; 1993) trabalhando com o isolamento e prevalência sorológica, utilizaram as células A-72 com resultados satisfatórios.

A presença de ECP também foi observada em CRFK, com formação de sincício, arredondamento e descamação da camada celular, porém necessitando de um maior período p.i. para manifestação destes efeitos, o que ocorreu geralmente 72 horas p.i. Os títulos encontrados nesta linhagem foram sempre menores em relação à A-72, chegando a um título máximo de 10^4 DICC₅₀/25 μ l na quinta passagem consecutiva, com seis dias de incubação. Foi observada também uma sensível diminuição do ECP quando em passagens seriadas altas (7 a 10 passagens), porém sem a perda da infectividade do vírus, que foi recuperada utilizando-se inoculações em A-72.

YASOSHIMA et al (1983) e APPEL (1988) citam como sensíveis, tanto para isolamento como para replicação

do CVC 1-71 as culturas PDK e CRFK. KOJIMA et al. (1986) também encontraram sensibilidade e formação de ECP em CRFK. WOODS (1982) utilizou com sucesso a A-72 e células de feto felino em estudos com o CVC.

Na linhagem MDCK até a quinta passagem não foi detectado ECP característico, apenas maior vacuolização das células infectadas quando comparadas com o controle. Este achado está em discordância com o trabalho de WILSON et al. (1986), no qual, estudando o efeito de vacinas combinadas CVC/PVC, utilizaram a MDCK como substrato revelador de ECP. O título encontrado foi muito semelhante aos obtidos em CRFK, ficando com o máximo de 10^4 DICC₅₀/25 µl na quinta passagem consecutiva, com seis dias de incubação.

A destacada presença de células em suspensão nesta linhagem foi considerada um fator limitante para um melhor acompanhamento das mudanças ocorridas na monocamada celular aderida à garrafa, sendo encontrado em grande número, tanto nos controles quanto nas células infectadas, a partir de 48 horas após o cultivo.

A procura de novas linhagens celulares estabelecidas, tem sido uma constante nos centros de pesquisa, para que possam ser usadas em isolamento, replicação e estudos das viroses caninas de maneira que estas doenças sejam elucidadas o mais pronta e extensivamente, sem a realização das contínuas preparações de culturas primárias que são onerosas e consomem muito tempo.

BINN et al. (1974) encontraram como sensíveis ao CVC 1-71 as PDK, TC, GSE e DEN e não encontraram sensibilidade em linhagens oriundas de suíno, bovino, macaco, WR de origem canina e de humanos. TINGPALAPONG et al. (1982) trabalharam com as linhagens A-72, CRFK, PDK e WR de origem canina, citando o isolamento apenas na A-72.

Observou-se neste estudo, ser o CVC de difícil cultivo, necessitando sempre de passagens em células mais sensíveis para sua ativação e aumento de título. Os títulos médios alcançados ficaram sempre em torno de 10^3 a 10^4 DICC₅₀/25µl, considerado baixo para obtenção de uma boa massa antigênica.

APPEL et al. (1979) e EVERMANN et al. (1989) citam que o CVC é de difícil cultivo, bastante exigente em requerimentos para crescimento e limitado a inoculações em hospedeiros vivos ou em culturas primárias oriundas deste hospedeiro. EVERMANN et al. (1989) relatam que o isolamento de vírus caninos é limitado, pois a maioria dos agentes necessitam de enzimas do hospedeiro para sua ativação, completa ou não.

O uso de linhagens primárias para cultivo do CVC apresenta limitações: dificuldades de cultivo, falta de padronização celular, presença constante de risco de contaminações víricas, bacterianas e fúngicas, bem como presença de anticorpos específicos dentre outros. BINN et al. (1980) citam que linhagens celulares primárias de rim canino frequentemente variam em sua sensibilidade para o CVC, o que seria contornado utilizando as células A-72. MOCHIZUK et al. (1987) concluem em trabalho de sorologia, que é pertinente manter uma linhagem contínua como CRFK, A-72, FC-cells, como indicadores adequados para o CVC. Estes achados condizem com os nossos resultados onde tínhamos a A-72 como célula ativadora e multiplicadora do vírus, dispensando o uso de culturas primárias e o uso das CRFK ou MDCK, menos sensíveis como mantenedoras e produtoras de massa viral.

Foi observado que o pH alcalino destruiu drasticamente a infectividade do CVC. O pH levemente ácido em torno de 5,0 a 7,0 foi o melhor para a estabilidade do vírus. O tempo de adsorção de 90 minutos mostrou-se mais eficiente que de 60 minutos. Não houve diferença significativa no tempo e amplitude de aparecimento de ECP para a mesma amostra de CVC congelada em -196, -70 e -20°C com três ciclos de congelamento/descongelamento e também após o uso de 20µg/ml de tripsina para uma possível ativação vírica, não tendo sido obtido, até o momento, o título de cada amostra para comparação. LAMARRE & TALBOT (1989) estudando o efeito do pH e temperatura em coronavírus humano, encontraram infectividade máxima em pH 6,0 quando incubada a 4 ou 33°C, sendo a influência do pH mais pronunciada a 33°C. O título infeccioso, revelado em L 132 (células de pulmão de feto humano), não mostrou redução significativa mesmo quando sujeito a 25 ciclos de congelamento e descongelamento.

A despeito de todas as medidas tomadas, as células A-72 tenderam a apresentar efeitos tóxicos com perda da camada celular entre a sexta e sétima passagens consecutivas, levando a uma dificuldade em manter esta linhagem por tempo e número suficiente para padronização e realização dos testes de SN.

4.10 PADRONIZAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS PARA O CULTIVO CELULAR EM MICROPLACAS

4.10.1 CONCENTRAÇÃO CELULAR POR PLACA

O comportamento celular em microplacas demonstrou ser muito crítico, principalmente com a linhagem A-72, tendo para isto que escolher as garrafas com as melhores monocamadas. Não foi encontrada na literatura consultada nenhuma informação sobre a concentração celular ótima por orifício para a linhagem A-72. Em nosso estudo foi encontrada uma concentração ótima em torno de 7,0 a 8,0 x 10⁴ cél/cm². As camadas confluíram dentro de 24 horas e nas melhores placas, permaneceram viáveis por sete dias de incubação à 37°C. Os problemas observados nos testes de concentração em garrafas se repetiram novamente, onde baixas e altas concentrações comprometeram a viabilidade celular.

Concentrações de ou 6,0 a 7,0 x 10⁴ cél/cm² foram constatadas como ótimas para a linhagem CRFK, que se manteve viável por cinco a sete dias de incubação à 37°C. Estes achados são semelhantes aos de MOCHIZUK et al. (1987) que trabalharam com uma concentração de 8,0 x 10⁵ cél/ml em microtitulação de CVC.

4.10.2 MEIO DE CULTURA E PROCEDIMENTO DE INCUBAÇÃO

A questão básica quanto a escolha do tipo de meio de cultura e o ambiente de incubação é sem dúvida a manutenção de um pH estável para o desenvolvimento celular, já que estamos fazendo uma cultura em sistema aberto.

Posto isto, concluímos que o uso do meio L15 (tamponado por aminoácidos livres) e a incubação sem o

uso de atmosfera de CO₂ foi o mais adequado para as duas linhagens (CRFK e A-72) em placas.

Ocorreu acidificação do meio em 12 horas de incubação quando se usou o L15 e o MEM-EAGLE-NEAA em atmosfera de CO₂.

A alcalinidade tornou-se crítica em 12 horas quando se utilizou o MEM-EAGLE-NEAA sem atmosfera de CO₂, causando morte celular em 24 horas.

4.10.3 VERIFICAÇÃO DO TEMPO DE LEITURA PARA TITULAÇÃO

Durante as titulações do CVC foi observado um tempo ótimo de leitura de 72 a 96 horas de incubação. Na literatura consultada só foram encontradas informações sobre o tempo total de incubação, que geralmente foi de cinco dias. Acima de 120 horas foram observadas alterações nas células de controle MOCHIZUK et al (1987).

4.11 SOROLOGIA POR IDAG

As lâminas com agar noble 0,9% mostraram ser mais eficientes em termos de definição de linhas de precipitação. Utilizando o perfurador de 4 mm de diâmetro, as linhas foram visíveis em 24 horas.

Quanto à coleta das amostras de soro, mesmo fornecendo todo o material necessário e informações precisas, não obtivemos respaldo das clínicas veterinárias de Belo Horizonte, sendo que quase a totalidade dos soros estudados foram coletados em uma única clínica. Informações sobre a vacinação dos animais em estudo, principalmente às referentes à vacina contra a coronavirose canina, foram escassas, dificultando sobremaneira a interpretação dos resultados. Estas dificuldades podem ser justificadas talvez, pelo uso nesta época, de vacinas importadas ilegalmente no país.

De 157 soros caninos testados, 29 deles (19%) foram considerados positivos para o CVC, sendo que não houve uma distribuição tendenciosa quanto a idade dos animais. Dos cães sabidamente vacinados contra a

coronavirose, apenas uma amostra, num total de cinco, foi considerada positiva.

A primeira vacina anti-coronavírus registrada no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária data de 18 de janeiro de 1993 (comunicação pessoal)⁵. Devemos salientar que como os soros estudados foram coletados antes do lançamento desta vacina comercial no Brasil, os 19% de soros positivos encontrados podem ser analisados como contato direto com vírus de campo ou como utilização de vacinas contra coronavirose importadas não oficialmente.

Não foi encontrada na literatura consultada nenhum trabalho abordando a IDAG para o CVC, mas por imunofluorescência indireta HELFER-BAKER et al. (1980) encontraram 14,8% de positivos ao CVC em cães domiciliares, 22,2% para o PVC e 7,4 % para ambas viroses. Já TOMA & MORAILLON (1980) encontraram anticorpos anti-CVC em 75% dos 417 cães estudados na região de Paris, através da soroneutralização em microplacas. No Brasil a presença de partículas virais caracterizadas morfológicamente como coronavírus foi encontrada por HAGIWARA et al. (1989) por microscopia eletrônica.

Levando-se em conta que o teste sorológico por IDGA foi utilizado apenas como um ensaio para se ter uma noção da ocorrência sorológica da coronavirose no Brasil, nossos achados não diferiram muito dos encontrados por HELFER-BAKER et al. (1980).

⁵ Sindicato Nacional da Indústria de Defensivos Animais (SINDAN)
R. Muniz de Souza, 1304 - Acimação - São Paulo - SP.

TABELA 1. FATORES LIMITANTES PARA MULTIPLICAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR A-72

LINHAGEM CELULAR	MEIO DE CULTURA	SORO FETAL BOVINO(SFB)	CONC. ¹ SFB	REPIQUE (semana)	GARRAFA	CONCENTRAÇÃO CELULAR (cel/cm ²) ²
A-72	MEM-EAGLE NEAA Sigma	CULTILAB	5%			
	MEM-EAGLE NEAA Gibco	FUNED	15%			
	L15 Sigma	FV-UFMG	20%	2 vezes	vidro	1.2×10^4
	L15 Gibco ³	Nutricell	10%	1 vez	plástico	$3-4 \times 10^4$

1. Concentração de Soro Fetal Bovino
2. Concentração Celular Inicial por cm²
3. Condição Ideal de Cultivo

TABELA 2. FATORES LIMITANTES PARA MULTIPLICAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR CRFK

LINHAGEM CELULAR	MEIO DE CULTURA	SORO FETAL BOVINO(SFB)	CONC. ¹ SFB	REPIQUE (semana)	GARRAFA	CONCENTRAÇÃO CELULAR (cel/cm ²) ²
CRFK	MEM-EAGLE NEAA Sigma	CULTILAB	5%			
	MEM-EAGLE NEAA Gibco	FUNED	15%			
	L15 Sigma	FV UFMG	20%	1 vez		1 x 10 ⁴
	L15 Gibco ³	Nutricell	10%	2 vezes	plástico vidro	2-3 x 10 ⁴ 4-5 x 10 ⁴

1. Concentração de Soro Fetal Bovino
2. Concentração Celular Inicial por cm²
3. Condição Ideal de Cultivo

TABELA 3. FATORES LIMITANTES PARA MULTIPLICAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR MDCK

LINHAGEM CELULAR	MEIO DE CULTURA	SORO FETAL BOVINO(SFB)	CONC. ¹ SFB	REPIQUE (semana)	GARRAFA	CONCENTRAÇÃO CELULAR (cel/cm ²) ²
MDCK	MEM-EAGLE NEAA Sigma	CULTILAB	5%			
	MEM-EAGLE NEAA Gibco	FUNED	15%			
	L15 Sigma	FV UFMG	20%	1 vez		1×10^4
	L15 Gibco ³	Nutricell	10%	2 vezes	plástico vidro	$2-3 \times 10^4$ $4-5 \times 10^4$

1. Concentração do Soro Fetal Bovino
2. Concentração Celular Inicial por cm²
3. Condição Ideal de Cultivo

TABELA 4. PADRONIZAÇÃO PARA MULTIPLICAÇÃO DO
CORONAVÍRUS CANINO EM LINHAGENS CELULARES

LINHAGEM CELULAR	TÍTULO 5*PAS ¹ .	ECP ²	INÍCIO ECP ² (h)	PAS ¹ SUCBS. ³	ADSORÇÃO (min)	pH
A-72	10 ⁶ DICC ₅₀ /25μL	+++	48-72	aumento título	90	5-7
CRFK	10 ⁴ DICC ₅₀ /25μL	++	72-96	diminuição título e ECP ²	90	5-7
MDCK	10 ⁴ DICC ₁₀ /25μL	-	-	-	90	5-7

1. Passagem
2. Efeito Citopático
3. Sucessivas

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1. A linhagem celular A-72 foi a mais sensível ao CVC, obtendo-se bons títulos em menor tempo. Foi a que melhor se prestou para a composição do sistema revelador de ECP já que 90% dos efeitos foram detectados em 48-72 horas. Porém é uma linhagem trabalhosa, sensível e não estável, devendo ser usada para ativação e isolamentos iniciais.

5.2. As linhagens CRFK e MDCK obtiveram títulos médios semelhantes, podendo ser usadas para manutenção e produção de massa antigênica, depois de ser ativada em A-72. Para os testes de SN as CRFK foram as indicadas já que temos a manifestação de ECP nesta linhagem, o que não ocorre com a MDCK, e maior resistência em relação à A-72.

5.3. As melhores condições de cultivo para a A-72 foram utilizando o meio L15 GIBCO com 10% de SFB em concentrações iniciais de $3,0$ a $4,0 \times 10^4$ cél/cm² em garrafas plásticas descartáveis, com repiques semanais e troca de meio com 5% de SFB a cada dois dias de incubação.

5.4. O uso das células A-72 em placas deve ser feito com concentrações iniciais de $7,0$ a $8,0 \times 10^4$ cél/cm² com média de trabalho de $1,0 \times 10^6$ cél/ml, em meio L15 com 5% de SFB em estufa a 37°C sem o uso de atmosfera de CO₂.

5.5. A despeito de todas estas medidas, as células A-72 tenderam a apresentar efeitos tóxicos com perda da camada celular entre a sexta e sétima passagens consecutivas, levando a uma dificuldade em manter esta linhagem por tempo e número suficiente para padronização e realização dos testes de SN.

5.6. Altas e baixas concentrações celulares iniciais são prejudiciais ao cultivo de A-72 levando a formação de grumos e muitas células em suspensão no

primeiro caso e, baixa capacidade de crescimento no segundo caso, havendo sempre perda celular.

5.7. As melhores condições de cultivo para as linhagens CRFK e MDCK foram utilizando meio MEM-EAGLE-NEAA com 10% de SFB em concentração inicial de 2,0 a $3,0 \times 10^4$ cél/cm² com repiques duas vezes por semana.

5.8 A linhagem CRFK exige cuidados constantes, porém foi mais estável que as A-72. Passagens consecutivas do vírus CVC, levam a uma queda no título e perda da capacidade de formação de ECP.

5.9. A linhagem MDCK foi a mais resistente, sendo laboriosa pelo tempo de tripsinização que é muito grande (10 a 20 minutos). O cultivo apresentou sempre muitas células em suspensão, dificultando a visualização das células aderidas na camada. Foi menos sensível ao CVC do que as A-72 e não apresentou formação de ECP até a quinta passagem consecutiva.

5.10. O vírus CVC K-378-20 foi de difícil cultivo, mantendo um título médio de 10^4 a 10^5 DIC₅₀/25µl, com tempo ótimo de leitura de 72 a 96 horas p.i.

5.11. As melhores condições de cultivo de CVC foram utilizando uma faixa de pH entre 5,0 e 7,0 (levemente ácido) com um tempo de adsorção ótimo de 90 minutos e formação de 90% de ECP em três dias nas A-72 e cinco dias nas CRFK. Os títulos encontrados em MDCK foram conseguidos após cinco a seis dias de incubação a 37°C. O meio alcalino diminuiu significativamente a infectividade do CVC.

5.12. Não foi notada diferença no tempo e características manifestadas em ECP quando usando a mesma amostra de CVC congelada a - 196, - 70 e - 20°C, com três ciclos de congelamento e descongelamento, apesar de não ter sido possível obter o título de cada etapa para uma conclusão mais prudente.

5.13. As titulações e os testes de SN devem ser feitos utilizando-se meio L15 com 5% de SFB em estufa a 37°C sem atmosfera de CO₂.

6. CONCLUSÕES

A concentração inicial de células, intervalo entre repiques, concentração de SFB, tipo e marca de meios de cultura e o tipo de garrafa utilizada para crescimento, foram encontrados como limitantes e críticos para o cultivo e manutenção das linhagens estudadas, principalmente no caso da linhagem A-72 que mesmo com todos estes fatores definidos, continuou a apresentar problemas em sua manutenção. Apesar disto, a A-72 foi a linhagem mais sensível à replicação do CVC que mostrou-se difícil de ser cultivado, tendo como fatores limitantes o pH, tempo de adsorção e cultura de células sensíveis, podendo ser mantido com títulos médios de 10^4 a 10^5 DICC₅₀/25µl nas linhagens CRFK e MDCK.

O CVC foi evidenciado sorologicamente por IDAG em 29 de 157 (19%) soros caninos coletados em período anterior ao início da comercialização oficial de vacinas para o CVC no Brasil.

7. SUMMARY

There were studied three continual cells lines (CRFK, MDCK and A-72), for the purpose of nutritional requirements and development and also for sensitivity to the canine coronavirus (CCV). The best conditions for A-72 line were done using the L-15 GIBCO media with 10% of fetal bovine sera (FCS) on initial concentrations of $3,0$ to $4,0 \times 10^4$ cells/cm² in disposable plastic bottles with weekly sub-culture and change of the medium with 5% of FCS each two days of incubation. Initial concentrations of $7,0$ to $8,0 \times 10^4$ cells/cm² in L-15 with 5% FCS at 37°C without the CO₂ atmosphere were excellent for the microplates cultures. It was the most sensitive to the CCV, obtaining good titers in less time, 10^5 - 10^6 DICC₅₀/25μL however the most difficult and unstable, being used for the initial activation and isolations. For the CRFK and MDCK lines the best conditions were using the MEM-EAGLE with non essential aminoacids (NEAA) with 10% of FCS on initial concentrations of $2,0$ to $3,0 \times 10^4$ cells/cm² with sub-culture twice a week. They were more resistant lines than the A-72, however, less sensitive to the CCV, and on MDCK there was not formation of citopatic effect (CPE). Initial concentrations of $6,0$ to $7,0 \times 10^4$ cells/cm² were the best for the CRFK culture on microplates, using L-15 media with 5% of FBS at 37°C without CO₂ atmosphere. For the replication of CCV sample K-378-20 the best conditions were using pH between 5,0 and 7,0, adsoption time of 90 minutes, with formation of 90% of CPE in three days in A-72 and five days in CRFK, obtaining the average of 10^5 DICC₅₀/25μl of infectant titer with reading best time of 72 to 96 hours after inoculation. Through the use of immunodifusion technique in agar gel (IDAG) it was seen the presence of 29 seras (19%) positive for the CCV K-378-20 in samples of 157 canine seras collected in Belo Horizonte in period before the commercialization of the CCV vaccines in the Brasil.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEL, M. Does canine coronavirus augment the effects of subsequent parvovirus infection?. **Veterinary Medicine**, v. 83, n. 4, p. 360-366, 1988.
- APPEL, M. , COOPER, B. J. , GREISEN, H. et al. Canine viral enteritis I. Status report on corona and parvo-like viral enteritides. **Cornell Veterinarian**, v. 69, n. 3, p. 123-133, 1979.
- BINN, L. N. , LAZAR, E. C. , KEENAN, K. P. et al. Recorvery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. **Proceedings United States of Animal Health Association**, v. 78, p. 359-366, 1974.
- BINN, L. N. , MARCHWICKI, R. H. , STEPHENSON, E. H. Establishment of a canine cell line: derivation, characterization, and viral spectrum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n.6, p.855-860, 1980.
- CARMICHAEL, L. E. , BINN, L. N. New enteric viruses in dogs. **Advances Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 25, p. 1-37, 1981.
- EUGSTER, A. K. , NAIRN, C. Diarrhoea in puppies: parvovirus-like particles demonstrated in their faeces. **The Southwestern Veterinarian**, v.30, n.1, p. 59-60, 1977.
- EVERMANN, J. F. , MCKEIRNAN, A. J. , EUGSTER, A. K. et al. Update on canine coronavirus infections and interactions with other enteric pathogens of the dog. **Companion Animal Practice Medicine**, v. 19, n. 2, p. 6-12, 1989.

- HAGIWARA, M. K., WALDMANN, M. Surto de gastroenterite canina causada por coronavirus. **Cães & Gatos**, v. 25, n. 2, p. 5-9, 1989.
- HELPER-BAKER, C., EVERMANN, J. F., McKEIRNANN, A. J. et al. Serological studies on the incidence of canine enteritis viruses. **Canine Practice**, v. 7, n. 3, p.37-42, 1980.
- KOJIMA, A. , TAKADA, H. , OKANIWA, A. Multiplication of canine coronavirus in CREK cells. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, n. 6, p. 1063-1070, 1986.
- LAMARRE, A. , TALBOT, P. J. Effect of pH and temperature on the infectivity of human coronavirus 229E. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 10, p. 972-974, 1989.
- MOCHIZUK, M. , SUGIURA, R. , AKUZAWA, M. Micro-neutralization test with canine coronavirus for detection of coronavirus antibodies in dogs and cats. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 49, n. 3, p. 563-565, 1987.
- NAKAJIMA, H. , USHIMI, C. Immunodiffusion studies of purified equine infectious anemia virus. **Infection and Immunity**, v. 3, n. 3, p. 373-377, 1971.
- REED, L. J. , MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
- STURMAN, L. S. , HOLMES, K. V. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 28, p. 35-112, 1983.
- TENNANT, B. J. , GASKELL, R. M. , JONES, R. C. Studies on the epizootiology of canine coronavirus. **Veterinary Record**, v. 132, n. 2, p. 7-11, 1993.
- TENNANT, B. J. , GASKELL, R. M. , KELLY, D. F. , CARTER, S. D. Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 11-18, 1991.

- TINGPALAPONG, M. , WAITMIRE, R. E. , WATTS, D. M. et al. Epizootic of viral enteritis in dogs in Thailand. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 9, p. 1687-1690, 1982.
- TOMA, B. , MORAILLON, A. Infection du chien par un virus antigéniquement apparenté au virus de la gastroentérite transmissible du porc. **Recue Medecine Veterinaire**, v. 156, n. 6, p. 464-470, 1980.
- WILSON, R. B. , HOLLADAY, J. A. , CAVE, J. S. A neurologic syndrome associated with use of a canine coronavirus-parvovirus vaccine in dogs. **The Compendium on Continuing Education Practitioner Veterinary**, v. 8, n. 2, p. 117-123, 1986.
- WOODS, R. D. Studies of enteric coronaviruses in a feline cell line. **Veterinary Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 427-435, 1982.
- YASOSHIMA, A. , FUJINAMI, F. , DOI, K. et al Case report on mixed infection of canine parvovirus and canine coronavirus - electron microscopy and recovery of canine coronavirus. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 25, n. 2, p. 217-225, 1983.