

Infecção de células BHK-21 cultivadas em monocamadas estacionárias por cepas de vírus PV e CVS

Infection of BHK-21 cells cultivated in stationary monolayers by PV and CVS strains

Alexandre Mendes Batista; Paula Sônia Cruz; Eliana de Almeida; Ana Elena Boamorte da Costa; Karin Corrêa Scheffer; Luciana Botelho Chaves; Andréa de Cássia Rodrigues da Silva; Graciane Maria Medeiros Caporale

Instituto Pasteur. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O vírus da raiva pode estar presente em diferentes tecidos e órgãos, tornando possível a sua replicação em diversos tipos de culturas celulares. Considerando a fundamental importância da produção desse vírus *in vitro* para a realização de testes diagnósticos, produção de soros hiperimunes e pesquisas, o objetivo deste estudo foi avaliar a infecção viral das cepas PV (*Pasteur Virus*) e CVS (*Challenge Virus Standard*) em linhagem de células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*). As células foram infectadas com as cepas PV e CVS e cultivadas em frascos estacionários de cultivo celular e em microplacas com lamínulas, a 37°C por até 96 horas. A cada três horas foram coletadas alíquotas do sobrenadante dos frascos, para acompanhamento da concentração das partículas virais, e lamínulas para avaliar a infecção viral nas células. As avaliações foram realizadas por imunofluorescência direta, para definição da maior diluição em que as suspensões virais infectaram 100% da monocamada confluyente de células BHK-21 e para avaliar o aumento da intensidade de fluorescência, expressa em cruzes (+ a ++++), identificando o antígeno viral, demonstrado por fotodocumentação. A presença de partículas virais foi observada a partir de nove horas pós-infecção, em ambas as cepas. As partículas virais das cepas PV e CVS no sobrenadante foram obtidas a partir de 15 e 18 horas de incubação, respectivamente, sendo observada a maior concentração de partículas nas suspensões virais das duas cepas, 72 horas pós-infecção. Portanto, o protocolo usado demonstrou eficiência, independente da cepa empregada, permitindo a obtenção de bons títulos nas suspensões virais produzidas.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus da raiva. Cepas PV e CVS. Células BHK-21. Replicação

viral.

ABSTRACT

The rabies virus can be present in different tissues and organs, so it makes possible its replication in a wide variety of cells cultures. Because of the critical importance of virus production *in vitro* to achievement of diagnostic tests, production of hyperimmune sera and researches, the aim of this study was evaluate the viral replication of strains PV (Pasteur Virus) and CVS (Challenge Virus Standard) in cells lines BHK-21 (Baby Hamster Kidney). The cells were infected with strains PV and CVS and cultivated on stationary cell culture flasks and on microplates with cover glass slides on 37°C until 96 hours. Every 3 hours aliquots of supernatant were collected of the flasks for monitoring the virus particles concentration and glass cover to evaluate viral infection in cells. The evaluations were performed by direct immunofluorescence, to determinate the higher dilution that the viral suspensions infected 100% of the BHK-21 confluent monolayer and to evaluate the increase of fluorescence intensity, express by crosses (+ to ++++), identifying the viral antigen demonstrated by photos. The presence of viral particles was observed from 9 hours post-infection with both strains. The viral particles of CVS and PV strains on supernatant were obtained from 15 and 18 hours of incubation, respectively and the higher concentration of particles on viral suspensions was observed 72 hours post-infection. Therefore, the protocol used demonstrated efficiency independent of viral strain used allowing the obtaining of good titers in viral suspensions produced.

KEY WORDS: Rabies virus. PV and CVS strains. BHK-21 cells. Viral replication.

INTRODUÇÃO

O vírus da raiva é intensamente neurotrópico, mas em animais infectados, após a replicação no sistema nervoso central (SNC), pode ser encontrado na maioria dos órgãos, nos quais muitas vezes pode ser eficientemente replicado. Não é surpreendente, portanto, que o vírus da raiva possa ser cultivado em uma imensa variedade de linhagens celulares.¹

Desde 1913, quando NOGUCHI e LEVADITI, citado por KING (1996),¹ aplicaram pela primeira vez técnicas de cultura de tecidos a

estudos *in vitro* do vírus da raiva, foi demonstrada a suscetibilidade de diversas culturas primárias de células, de rim de diferentes espécies animais, à infecção com o vírus da raiva, permitindo o uso desse sistema para a produção de vacinas.²⁻⁵

Embora as linhagens celulares de origem neuronal tenham sido consideradas sistemas mais sensíveis para testes diagnósticos, com o aparecimento das linhagens celulares de cultura contínua uma grande diversidade de células não neuronais tem sido usada

atualmente em estudos e procedimentos relacionados ao vírus da raiva.⁶⁻¹¹

A linhagem contínua de células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*)¹² foi descrita como substrato favorito para investigação *in vitro* do vírus da raiva por sua extrema suscetibilidade, passando a ser usada, portanto, para produção de vírus empregado em estudos de concentração e purificação, investigações de microscopia eletrônica e produção de vacinas concentradas e purificadas.¹³

Com o estabelecimento de testes diagnósticos da raiva, revelados pela ligação de anticorpos específicos conjugados à substância fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) aos antígenos virais, a linhagem de células BHK-21 também passou a ser usada para o isolamento de variantes de vírus de rua¹⁴ e para a avaliação sorológica,¹⁵⁻¹⁷ sendo necessária, portanto, a produção de vírus fixos nessa linhagem celular para a execução das técnicas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a infecção viral das cepas PV (*Pasteur Virus*) e CVS (*Challenge Virus Standard*) em linhagem de células BHK-21 cultivadas em monocamadas estacionárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

Foi utilizada linhagem de células BHK-21 (C-13; ATCC CCL-10), mantida em frascos estacionários de plástico com superfície aderente de 25 cm² (T25). O meio essencial mínimo de Eagle (MEM), com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, foi utilizado para o cultivo celular, sendo os frascos mantidos a 37°C por 3-4 dias para obtenção das monocamadas confluentes.

Vírus

As cepas de vírus fixos PV e CVS adaptadas à linhagem celular BHK-21, em monocamadas estacionárias, foram utilizadas para infectar as células. Os títulos infectantes de ambas as cepas virais foram determinados em microplacas de 96 orifícios, preparadas adicionando-se 50µL de 5x10⁴ células BHK-21 em cada orifício, com 50µL de diluições seriadas em razão 2 de cada uma das cepas. Após 24 horas de incubação, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, o sobrenadante foi aspirado dos orifícios; as monocamadas de células foram fixadas com acetona 80% gelada. Foi adicionado conjugado antivírus da raiva, produzido no Instituto Pasteur – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) –, lote IP.TOT3/06, e as microplacas foram incubadas a 37°C por uma hora.

Por observação em microscópio invertido LEICA DMIL para fluorescência, aumento 100x, uma dose infectante em cultura de células (DICC100) foi estabelecida como sendo a diluição do vírus que infectou 100% das células observadas em um orifício da microplaca, o que foi correspondente a 1:80 para PV e 1:300 para CVS.

Suspensões BHK-21/Vírus

Suspensões BHK-21/PV e BHK-21/CVS foram preparadas para a produção das cepas PV e CVS em cultura da linhagem celular BHK-21 e para o preparo da infecção em lamínulas de vidro. Para tanto, as células em monocamadas confluentes dos frascos T25 foram individualizadas com solução Tripsina-EDTA (0,2%), ressuspensas com MEM na concentração de 10⁵ células/mL e adicionadas na mesma proporção a cada suspensão das cepas

de vírus PV e CVS, diluídas em MEM 1:80 e 1:300, respectivamente.

Produção das cepas PV e CVS em cultura de células BHK-21

Foram utilizados quatro frascos T25, sendo dois para a suspensão BHK-21/PV e dois para BHK-21/CVS. Em cada frasco foram adicionados 2mL da suspensão célula/vírus e 8mL de MEM. Os frascos foram mantidos por 96 horas, a 37°C, e a cada três horas 100µL do sobrenadante dos frascos foram coletados e armazenados a -20°C, até o momento do uso.

Avaliação da produção dos antígenos

Para a determinação da DICC100 nas alíquotas coletadas foi realizado o teste de imunofluorescência direta (IFD) em microplacas de 96 orifícios. Foram realizadas 12 diluições seriadas de cada alíquota, na razão 2, começando de 1:2, colocando-se 100µL da alíquota no primeiro orifício e adicionando-se 100µL de MEM. Em seguida, foram adicionados 50µL de MEM e 50µL de células BHK-21 na concentração de 10^5 células/mL. As microplacas foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas e as células foram fixadas, em banho de gelo, com acetona 80% gelada.

A reação foi revelada com adição de conjugado antivírus da raiva produzido pelo Instituto Pasteur, lote IP.TOT3/06, diluído 1:240. A leitura foi realizada em microscópio invertido LEICA DMIL para fluorescência com aumento de 100x. A DICC100 foi determinada pela maior diluição em que as suspensões virais infectaram 100% do tapete confluyente de células BHK-21.

A presença do antígeno viral na primeira diluição das alíquotas (1:2) nas microplacas foi analisada pela observação do aumento da intensidade de fluorescência, expressa em cinco classes, sendo: classe 0 (-) ausência de focos fluorescentes; classe 1 (+) com raros focos fluorescentes, menos de 25% do campo analisado; classe 2 (++) com focos fluorescentes em 50% do campo analisado; classe 3 (+++) com focos fluorescentes em 75% do campo analisado; e classe 4 (++++) com focos fluorescentes em mais de 75% do campo analisado. Ressalta-se que o campo analisado foi toda a monocamada de células dos orifícios da microplaca.

Infecção das células em lamínulas

Foram colocadas lamínulas de vidro em microplacas de seis orifícios e adicionados 200µL das mesmas suspensões, BHK-21/PV e BHK-21/CVS e 2mL de MEM. Foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, no período máximo de 96 horas. A cada três horas uma lamínula de cada cepa viral foi coletada, fixada por dez minutos em acetona PA gelada e armazenada a -20°C. As lamínulas foram aderidas às lâminas de vidro para a realização da IFD, e o mesmo lote de conjugado fluorescente antivírus da raiva, com a mesma diluição, foi utilizado para a revelação do teste.

As lâminas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida, por 30 minutos, lavadas com solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01 molar pH 7.2 e água deionizada; após a secagem foi adicionada glicerina tamponada pH 8.5. A observação da reação foi realizada em microscópio invertido Nikon Eclipse TE2000-S, para fluorescência, com lâmpada HBO-100, aumento 200x e demonstrada por meio de fotodocumentação.

RESULTADOS

Avaliação da produção dos antígenos

Conforme demonstram a Tabela 1 e a Figura 1, a avaliação da presença do antígeno viral nas suspensões coletadas em diferentes períodos, expressando em cruces o aumento da intensidade de fluorescência produzida pela infecção viral das alíquotas 1:2 nas células BHK-21 cultivadas em microplacas, demonstrou classe 3 (+++) na observação de focos fluorescentes com a cepa PV e classe 2 (++) com CVS, nas alíquotas coletadas no momento zero da infecção.

Nas alíquotas coletadas no período entre 3 e 18 horas pós-infecção, observou-se diminuição da concentração de partículas, com menos de 25% de infecção do campo. A partir de 21 horas pós-infecção houve aumento gradativo da concentração de partículas virais, permitindo a observação de intensidade de fluorescência classe 2 (++) , passando para classe 3 (+++) nas alíquotas de 24 horas e classe 4 (++++) com 27 horas, sendo observada essa classe em todas as alíquotas seguintes até 96 horas pós-infecção.

Interpretação dos resultados: classe 0 (-), ausência de focos fluorescentes; classe 1 (+), com raros focos fluorescentes, menos de 25% do campo analisado; classe 2 (++) , com focos fluorescentes em 50% do campo analisado; classe 3 (+++) , com focos fluorescente em 75% do campo analisado; e classe 4 (++++), com focos fluorescentes em mais de 75% do campo analisado.

A Figura 2 demonstra os valores DICC100 das suspensões virais produzidas por infecção com as cepas PV e CVS, após os diferentes momentos. Observou-se que no período de 3 a 24 horas pós-infecção ambas as cepas mantiveram baixa concentração viral. De 24 a 48 horas, a suspensão viral infectada com a cepa CVS apresentou maior concentração das

partículas virais em relação à infectada com a cepa PV, embora esta também tenha apresentado elevação nesse período. Na alíquota coletada 72 horas pós-infecção, observou-se a presença da maior concentração de antígenos das cepas PV e CVS com DICC100 correspondente a 1:96, seguida de diminuição na alíquota coletada 96 horas pós-infecção.

Tabela 1. Intensidade de fluorescência expressa em cruces, identificando a presença de antígenos das cepas PV e CVS em suspensões virais diluídas 1:2.

Período de incubação (h)	BHK-21/PV	BHK-21/CVS
0	+++	++
3	+	+
6	+	+
9	+	+
12	+	+
15	+	+
18	+	+
21	++	++
24	+++	+++
27	++++	++++
30	++++	++++
33	++++	++++
36	++++	++++
48	++++	++++
72	++++	++++
96	++++	++++

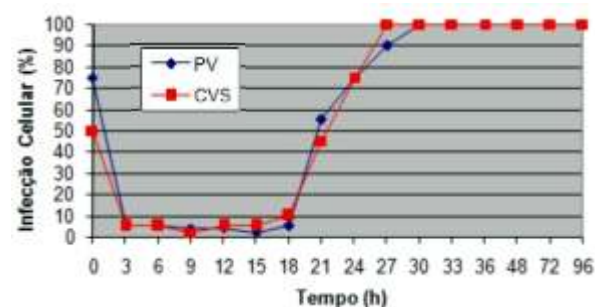


Figura 1. Percentual de infecção das monocamadas confluentes de células BHK-21 com suspensões virais diluídas 1:2, reveladas por meio da técnica de imunofluorescência direta.

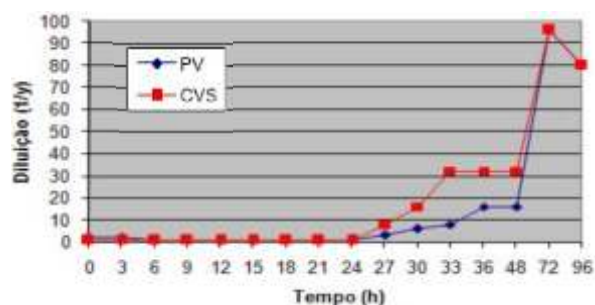


Figura 2. Valores de DICC100 das suspensões virais em monocamada confluyente de células BHK-21, reveladas por meio da técnica de imunofluorescência direta.

Infecção das células em lamínulas

Avaliando-se as lamínulas coletadas a partir de nove horas pós-infecção da cultura de células BHK-21 pelas cepas PV e CVS foi possível observar reação positiva para o antígeno da raiva, mas, devido à pouca intensidade de

fluorescência (menos de 5% do campo observado), não foi possível fotodocumentá-la. Na Figura 3 está demonstrado o aumento gradativo da presença dos antígenos virais em células BHK-21 infectadas com as cepas PV e CVS, nos períodos de 12, 18 e 24 horas.

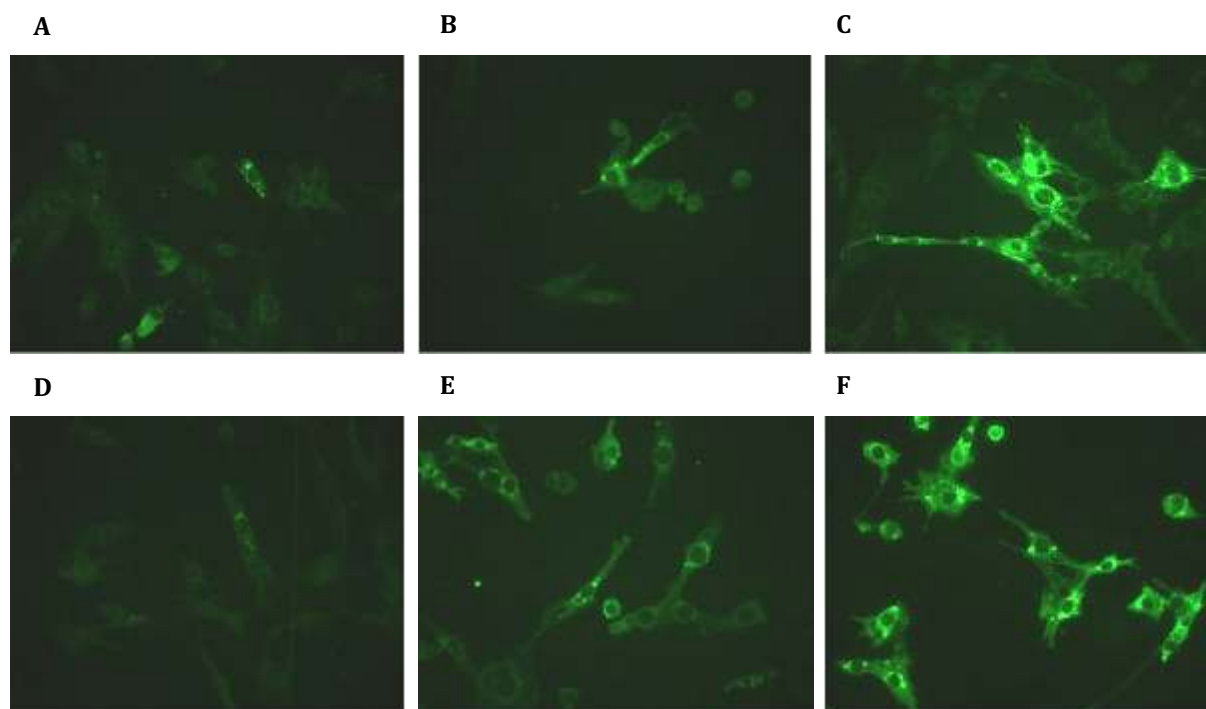


Figura 3. Imunofluorescência direta de células BHK-21 infectadas com as cepas PV e CVS (aumento 200x). (A) Células BHK-21 com 12 horas pós-infecção com a cepa CVS. (B) Células BHK-21 com 18 horas pós-infecção com a cepa CVS. (C) Células BHK-21 com 24 horas pós-infecção com a cepa CVS. (D) Células BHK-21 com 12 horas pós-infecção com a cepa PV. (E) Células BHK-21 com 18 horas pós-infecção com a cepa PV. (F) Células BHK-21 com 24 horas pós-infecção com a cepa PV.

DISCUSSÃO

Embora a avaliação dos títulos em DICC 100, apresentados pelas alíquotas de ambas as suspensões virais produzidas pelas células BHK-21 infectadas com as cepas PV e CVS, tenham demonstrado que no período de 0 a 24 horas pós-infecção as suspensões não atingiram concentrações de partículas virais satisfatórias, os títulos de 27 a 48 horas pós-infecção indicam a presença de partículas virais com aumento gradativo das

concentrações, sendo superiores nas suspensões cuja infecção foi pelo vírus CVS.

A diferença observada na avaliação realizada por IFD em microplacas, a qual apresentou intensidade de fluorescência de classe 3 (+++) para PV e classe 2 (++) para CVS nas alíquotas coletadas no momento 0 da infecção, apesar de ambas as cepas terem sido preparadas para infectar 100% das células, pode ser a explicação para os diferentes

títulos apresentados nas suspensões preparadas com infecção pelas duas cepas virais, no período de 27 a 48 horas pós-infecção. Pode, ainda, estar relacionada às fases de adsorção e penetração das partículas virais de cada cepa utilizada, sugerindo que as partículas da cepa CVS tenham adsorvido e penetrado nas células mais rapidamente do que as partículas da cepa PV, sendo liberadas em maior quantidade para o sobrenadante.

A diminuição da concentração das partículas virais nas suspensões das cepas PV e CVS entre 3 e 24 horas pós-infecção já era esperada, devido ao período necessário para adsorção, penetração e replicação das partículas virais nas células.

A partir de 21 horas pós-infecção a concentração começou a aumentar, atingindo o pico máximo em 27 horas em ambas as cepas, mostrando que com pouco mais de um dia novas partículas virais íntegras já estão brotando para infectarem novas células.

A obtenção de grande concentração de partículas virais da cepa CVS com 48 horas pós-infecção torna possível, com este período, o estabelecimento de protocolos de replicação para obtenção

de concentrações adequadas para uso em testes diagnósticos.¹⁹ Ambas as cepas virais atingiram o máximo de rendimento antigênico com 72 horas pós-infecção, portanto, o momento ideal de coleta de sobrenadante para obtenção da maior concentração viral para uso. O fato de ainda com 96 horas pós-infecção muitas partículas virais serem liberadas mostra que as células mantêm-se viáveis para a produção de vírus.

A produção de vírus da raiva em linhagens celulares é extremamente importante, tanto para a obtenção de conhecimento sobre a cepa viral empregada como para a produção de grandes volumes ou concentrações de antígeno que poderão ser utilizados para a purificação de proteínas, obtenção de soros hiperimunes, produção de imunorreagentes, realização de testes diagnósticos e produção de vacinas.^{1,18,19}

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ivanete Kotait, Assistente Técnica de Saúde, pela valiosa contribuição, e à Dra. Zélia Maria Pinheiro Peixoto, ambas do Instituto Pasteur, pelo incentivo e contribuição técnica.

REFERÊNCIAS

1. King AA. Cell culture of rabies virus. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4. ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 114-30.
2. Fenje P. A rabies vaccine from hamster kidney tissue cultures: preparation and evaluation in animals. *Can J Microbiol.* 1960;6:605-9.
3. Lin F, Zeng F, Lu L, Lu X, Zen R, Yu Y, et al. The primary hamster kidney cell rabies vaccine: adaptation of viral strain, production of vaccine, and pre and postexposure treatment. *J Infect Dis.* 1983;147:467-73.
4. Atanasiu P, Tsiang H, Gamet A. A new rabies vaccine for human use prepared in primary tissue culture. *Ann Inst Pasteur: Microbiol.* 1974;125B:419-32.

5. Steenis GV, Wezel ALV, Hannik CHA, Marel PVD, Osterhaus ADME, Groot IGM, et al. Immunogenicity of dog kidney cell rabies vaccine (DKCV). In: Kuwert E, Merieux C, Koprowski H, Bogel K, editores. Rabies in the tropics. Berlin, Springer-Verlag. 1985. p. 172-80.
6. Clark HF. Systems for assay and growth of rhabdovirus. In: Bishop DHL, editor. Rhabdoviruses. Boca Raton: CRC Press; 1979. p. 23-41.
7. Clark HF. Rabies serogroup viruses in neuroblastoma cells: propagation, "autointerference" and apparently random back-mutation of attenuated viruses to the virulent state. Infect Imm. 1980;27:1012-22.
8. Iwasaki T, Clark HF. Rabies virus infection in mouse neuroblastoma cells. Lab Invest. 1977;36:578-84.
9. Tsiang H. An in vitro study of rabies pathogenesis. Bull Inst Pasteur. 1985;83:41-56.
10. Montagnon, BJ, Fournier P, Vicent-Falquet JC. Un nouveau vaccine antirabique à usage humain: rapport préliminaire. [A new rabies vaccine for human use: preliminary report.] In: Kuwert E, editor. Rabies in the tropics. Berlin: Springer-Verlag; 1985. p. 138-43.
11. Bordignon J, Piza AT, Silva MA, Caporale GMM, Carrieri ML, Kotait I, Zanetti CR. Isolation and replication of Rabies Virus in C6 Rat Glioma Cells (Clone CCl107). Biologicals. 2001;29:67-73.
12. MacPherson I, Stoker M. Polyoma transformation of hamster cell clones-an investigation of genetic factors affecting cell competence. Virology. 1962;16:147-51.
13. Wiktor TJ, Clark HF. Growth of rabies virus in cell culture. In: Baer GM. The natural history of rabies. New York: Academic Press; 1975. p. 155-79.
14. Rudd RJ, Trimarchi CV, Abelseth MK. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. J Clin Microbiol. 1980;12:590-3.
15. Smith JS, Yacer PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. Bull Wld Hlth Org. 1973;48:535-41.
16. Zalan E, Wilson C, Pukitis D. A microtest for quantitation of rabies virus neutralizing antibodies. J Biol Stand. 1979;7:213-20.
17. Favoretto SR, Carrieri ML, Tino MS, Zanetti CR, Pereira OAC. Simplified fluorescent inhibition microtest for the rabies neutralizing antibodies. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1993;35(2):171-5.
18. Caporale GMM, Silva ACR, Peixoto ZMP, Chaves LB, Carrieri ML, Vassão RC. First production of fluorescent anti-ribonucleoproteins conjugate for diagnostic of rabies in Brazil. J Clin Lab Anal. 2009;23:7-13.
19. Schneider LG. Concentration and purification. In: Baer GM. The natural history of rabies. New York: Academic Press; 1975. p.125-40.

Recebido em: 08/09/2009
Aprovado em: 22/11/2009

Correspondência/correspondence to:

Graciane Maria Medeiros Caporale
Av. Paulista, 393 – Cerqueira César – CEP: 01311-000 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: 55 11 3145-3145 – graciecaporale@yahoo.com.br