

AMAURY APOLONIO DE OLIVEIRA

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA DOENÇA DE
AUJESZKY EM SUÍNOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS. COMPA-
RAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE SORONEUTRALIZAÇÃO E DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

FUNDAÇÃO DE ESTUDO E PESQUISA
EM MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Tese apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

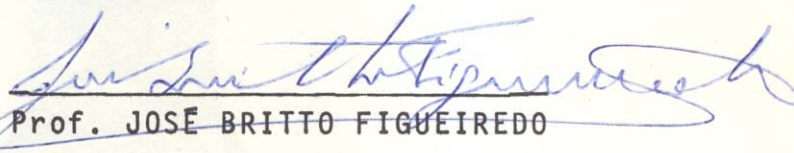
Belo Horizonte
Minas Gerais - BRASIL
1976

Tese aprovada em 17/05/1976

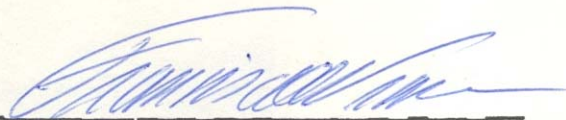
BANCA EXAMINADORA:



Prof. RONALDO REIS



Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO



Prof. FRANCISCO CECÍLIO VIANA

O autor agradece:

- ao Professor RONALDO REIS pela competente orientação e dedicação dispensadas durante a realização do trabalho;

- à EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA;

- à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES;

- à EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG;

- ao CONSELHO DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - CPq-UFMG;

- a todos aqueles que, direta ou indiretamente, prestaram seu estímulo imprescindível e valiosa colaboração.

	<u>Página</u>
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
3. Material e Métodos	11
4. Resultados	23
5. Discussão	30
6. Conclusões	36
7. Resumo	38
8. Summary	41
9. Referências Bibliográficas	44

Coube a ALADAR AUJESZKY, em 1902, o mērito de descrever a doença que posteriormente viria receber o seu nome. A partir de entāo, muitas observaçōes a respeito da "doença de Aujeszky" (DA) foram sendo realizadas e a ampliaçāo desses conhecimentos revelou a importāncia desta infecçāo em todo mundo, principalmente na Europa Central.

O crescente aumento dos rebanhos suīnos tem propiciado tambēm a expansāo da DA, notadamente onde a criaçāo desses animais vem recebendo maiores incentivos. Dados epidemiolōgicos da Bēlgica (LEUNEN & cols., 1974), Dinamarca (BITSCH, 1974), Espanha (COMBAIRE, 1974), Hungria (KOJONOK, 1974), Itālia (LODETTI & LODRIN, 1974), Holanda (AKKERMAN, 1974), Tchecoslovāquia (GRUNERT & ZUFFA, 1974), revelam que nos ūltimos anos a DA se mantēm em nīveis bastante altos.

O Brasil tem sido considerado um importante foco da doença, ocorrendo com maior freqũēncia nos Estados de Sāo Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Rio

Grande do Sul e Minas Gerais. Dados sobre focos da doença estão citados em REIS (1973).

Embora Minas Gerais possua o terceiro rebanho suíno do país, não existem trabalhos que ofereçam maiores informações sobre as infecções nesta espécie em geral e, DA, em especial. As pesquisas realizadas em nosso meio têm-se limitado à sorologia em focos e ao diagnóstico de casos naturais, em leitões lactentes (CARNEIRO, 1941; HIPÓLITO, 1960 e SILVA & GIOVINE, 1966).

Devido a necessidade de se obter informações mais exatas sobre a extensão da DA muitos pesquisadores têm se dedicado aos trabalhos no campo da imunologia, visando ao aprimoramento de técnicas adequadas que proporcionem o equacionamento dos problemas relacionados com a doença. Assim, os autores procuram associar as características fundamentais de um método de diagnóstico: sensibilidade, especificidade, simplicidade e economia.

As provas de soroneutralização (SN) têm sido bastante usadas sendo, até o momento, as que oferecem resultados mais eficientes em levantamentos sorológicos.

Embora o método de imunofluorescência indi-

reta (IFI) tenha sido empregado com êxito em várias outras viroses, sua utilização em DA é relativamente recente, limitando-se a algumas poucas pesquisas e com resultados contraditórios.

Basicamente, os objetivos do presente trabalho abrangem os seguintes aspectos:

- 1) levantamento sorológico da DA em suínos no Estado de Minas Gerais;
- 2) aplicação da IFI na titulação de anticorpos contra o vírus da doença de Aujeszky (VDA);
- 3) comparação entre os títulos da SN em camundongos e da IFI.

SHOPE (1931) demonstrou, pela primeira vez, anticorpos neutralizantes, em suínos, postos em evidência quando se realiza a mistura soro-vírus e se inocula em animais sensíveis à infecção experimental como cobaias e camundongos.

CARNEIRO (1939) através da SN em coelhos e cobaias, realizou estudo sobre a presença de anticorpos anti-DA, em suínos criados em focos da doença em bovinos. Dos 32 soros examinados, 28 (87.5%) revelaram a presença de anticorpos, demonstrando serem os suínos prováveis portadores do vírus e disseminadores da doença.

KOJONOK & CRECZI (1956) trabalharam com soros de suínos imunizados contra DA, peste suína e erisipela suína. Os soros foram diluídos a 1:20, 1:40, 1:80 e o estudo da neutralização do vírus foi realizado em camundongos de 35 dias. Os resultados demonstraram que os soros contra DA apresentaram consideráveis índices de anticorpos específicos em relação aos demais so-

ros examinados e também ótima sensibilidade do camundongo à técnica.

HIPÓLITO & cols. (1960) isolaram e identificaram, num surto de doença em suínos no Estado de Minas Gerais, uma amostra de vírus que se comportou em todas as provas como agente da DA. Realizaram em cobaios os testes sorológicos de 15 soros de suínos, provenientes da criação onde se verificou o foco. Constataram que 53% destes animais apresentavam anticorpos neutralizantes contra DA.

JOHNSTON & WITTRICA (1961) utilizando a técnica descrita por SHOPE em cobaios, procederam à titulação de anticorpos anti-DA, usando soros de suínos suspeitos e previamente imunizados a partir de vacina preparada com amostra isolada no foco. Somente os soros de animais vacinados apresentaram índices de positividade; entretanto, os autores evidenciaram o bom funcionamento da técnica em cobaios.

MACKAY & cols. (1962) relataram estudo realizado em rebanhos suínos no Oeste dos Estados Unidos, através de cultura de tecido. Encontraram anticorpos anti-DA em 83% dos rebanhos afetados; contudo, não havia sinal da infecção nas localidades vizinhas à estudada.

Os autores concluíram ainda que, apesar da alta virulência do agente da DA, sua disseminação é muito baixa.

BURROWS (1963) realizou estudo sorológico em suínos abatidos em matadouros de Belfast, provenientes de 17 áreas irlandesas. Das 702 amostras testadas em cultura de células, 217 (31%) apresentaram anticorpos contra a DA.

BORGEN & BENEDIXEN(1965) estudaram a incidência e distribuição geográfica da infecção na Dinamarca. A completa neutralização do soro contra 100DICT₅₀ (dose infectante em cultura de tecido) foi considerada como presença de anticorpos protetores. Não se identificaram anticorpos em 535 suínos de corte, enquanto 9 de 12 matrizes e 62 de 753 varrões foram reagentes ao teste.

HOWARTH & PAOLI (1968) relatam um surto de DA numa criação de suínos da Califórnia na qual, durante três anos, morreram 1700 animais. Observaram que as perdas verificadas no local do estudo eram devidas às drásticas mudanças climáticas que facilitavam o desencadeamento da doença.

HOWARTH (1969) realizou trabalho sobre a prevalência da infecção em suínos californianos. Dos 680

soros examinados, 197(29%) apresentaram anticorpos contra DA. O autor constatou também que a maior ocorrência de positividade foi obtida nas amostras colhidas no final do verão, comprovando premissa do seu trabalho anterior, no qual afirmara serem as variações de temperatura responsáveis pelo surgimento da doença.

FRASER & RAMACHANDRAN (1969) em experiências comparadas com ratos e camundongos, observaram a sensibilidade destes animais ao VDA considerando-se, principalmente, o índice de mortalidade, duração da infecção, patogenia e via de inoculação. Os camundongos apresentaram-se mais sensíveis na evidenciação do vírus. Devido a isto, foram submetidos a trabalhos sorológicos, demonstrando melhor funcionamento em testes realizados com animais jovens.

TOMA & cols. (1974) descreveram estudo epidemiológico sobre a DA, realizado em suínos de 28 departamentos franceses. Os resultados mostraram que a infecção está praticamente localizada no Oeste do país, apresentando índice de 10% de positividade.

BUNN & cols. (1975) estudaram a prevalência da DA em porcos do Estado de Illinois, através de cultura de células. Das 1224 amostras de soro estudadas, 52

(4.25%) foram positivas, com títulos variando de 1:4 a 1:64.

Embora a imunofluorescência tenha sido bastante utilizada na evidencição do vírus da doença de Aujeszky (ALBRECHT & cols., 1963; MEYLING & BITSCH, 1967; STEWART & cols., 1967; SERRA & MANIOVANI, 1968; SABŐ & RAJACANI, 1970 e SVOBODOVÁ & SABŐ, 1970), a sua aplicação na titulação de anticorpos merece estudos mais apurados, existindo poucos trabalhos que se referem ao assunto.

FOMIN (1966), citado por SERRA & MANIOVANI (1968), têm obtido sucesso, empregando a IFI na titulação de anticorpos anti-Aujeszky.

JENTZSCH (1968) procedeu à titulação de anticorpos de 24 amostras de soro de suínos, comparando os resultados obtidos na imunofluorescência com a soro-neutralização em cultura de tecido. Devido à impossibilidade de se detectar o vírus nas impressões de lâminas, o autor considerou muito limitada a aplicação da IFI em Aujeszky.

1. Animais de laboratório

Utilizaram-se camundongos "Swiss", linhagem "Randon-CF-CPA", com idade variando entre 16-18 dias. Estes animais foram divididos em grupos de oito e submetidos às provas de soroneutralização e titulação do vírus.

Camundongos adultos tiveram seus cérebros removidos para o preparo de suspensão normal ou quando inoculados com VDA serviram para impressões de lâminas positivas.

2. Vírus

A amostra do VDA utilizada neste trabalho foi isolada de cérebro de bovino, no município de Almenara, Estado de Minas Gerais, gentilmente cedida pelo Dr. Renato Augusto da Silva. Inicialmente, o vírus foi mantido em laboratório por passagens de coelhos, representando um total de sete passagens nesta espécie. Em seguida, a amostra foi adaptada em camundongo, sendo

realizadas 86 passagens nestes animais, pela via intracerebral. A última passagem foi inoculada em cerca de 200 camundongos de 16-18 dias. Os cérebros foram colhidos, assepticamente, na fase final da doença e preparada uma suspensão a 20% em água destilada, estéril, com 2% de soro inativado de equino. A suspensão foi distribuída em frascos tipo penicilina, submetidos à prova de esterilidade, titulada e guardada à temperatura de -20°C. O título alcançado pelo vírus foi igual a $10^{-2.8}$ DL50/0,03 ml.

3. Soros

3.1. Padronização de técnicas

Para a padronização da SN utilizaram-se cinco imunossoros anti-DA*, designados por A, B, C, D e E, preparados em suínos e um "pool" de soros de sete coelhos vacinados com vacina inativada pela beta-propiolactona.

* Gentilmente fornecido pelo Prof. J.A. HOWARTH, Epidemiology and Preventive Medicine, Dep. - School of Vet. Med., Universidade da Califórnia, Davis (USA) - 95616

A IFI foi avaliada por meio de testes realizados com os soros-ímmunes anti-DA de origem suína nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 - 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 - 1:100, 1:200.

Na prova de SN os soros foram trabalhados nas diluições de 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625.

3.2. Levantamento

Colheram-se 905 amostras de sangue de suínos, procedentes de 31 municípios do Estado de Minas Gerais. Deste local, 556 foram obtidas em um matadouro de Belo Horizonte e 254 de matrizes e varrões de criações particulares. Os sangues foram centrifugados a 40°C, inativados em banho-Maria a 56°C por 30 minutos e armazenados em congelador a -20°C. Pequena fração de cada amostra foi estocada antes da inativação, a fim de ser tituladas pela IFI. No Quadro I, são apresentados alguns detalhes referentes ao levantamento sorológico.

4. Técnicas sorológicas

4.1. Soroneutralização

Esta prova foi realizada com os imunossoros A, B, C, D, E, de origem suína e com o "pool" dos sete

A IFI foi avaliada por meio de testes realizados com os soros-ímmunes anti-DA de origem suína nas diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 - 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 - 1:100, 1:200.

Na prova de SN os soros foram trabalhados nas diluições de 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625.

3.2. Levantamento

Colheram-se 905 amostras de sangue de suínos, procedentes de 31 municípios do Estado de Minas Gerais. Deste local, 556 foram obtidas em um matadouro de Belo Horizonte e 254 de matrizes e varrões de criações particulares. Os sangues foram centrifugados a 40°C, inativados em banho-Maria a 56°C por 30 minutos e armazenados em congelador a -20°C. Pequena fração de cada amostra foi estocada antes da inativação, a fim de ser tituladas pela IFI. No Quadro I, são apresentados alguns detalhes referentes ao levantamento sorológico.

4. Técnicas sorológicas

4.1. Soroneutralização

Esta prova foi realizada com os imunossoros A, B, C, D, E, de origem suína e com o "pool" dos sete

- h) inocular camundongos da mesma idade com as diluições controles dos vírus;
- i) observar durante 10 dias os camundongos que apresentarem sintomas da doença;
- j) mediante a fórmula de REED & MUENCH (1938) ordenar e calcular o título de vírus e da mistura soro-vírus que protegem 50% dos camundongos inoculados.

Os soros trabalhados em diluição superior a 1:2 foram diluídos em água destilada com 2% de soro inativado de eqüino.

Os camundongos que morreram 48 horas após as inoculações foram examinados através da imunofluorescência direta, descrita por SABŐ & RAJACANI (1970).

4.2. Imunofluorescência indireta

4.2.1. Fracionamento do soro

O fracionamento das globulinas do soro de suíno com sulfato de amônio foi realizado de acordo com a técnica descrita por REIS (1973), constando das seguintes fases:

- 1) colocar o soro sob agitação magnética e lentamente adicionar igual volume solução saturada de sulfato

- de amônio. Esta suspensão é deixada em geladeira por uma hora;
- 2) centrifugar a 3.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C e descartar o sobrenadante;
 - 3) dissolver o precipitado em água destilada fria na metade do volume descartado. Reprecipitar com um volume igual de solução saturada de sulfato de amônio;
 - 4) centrifugar novamente o precipitado a 3000 rpm durante 15 minutos e descartar o sobrenadante;
 - 5) ressuspender o precipitado em um volume de salina fria igual a metade do volume original do soro;
 - 6) colocar a gamaglobulina para dialisar em Becker com salina 0.85% a 4°C, sob agitação magnética, com troca periódica da água de diálise até o desaparecimento de sulfato de amônio, verificado pelo teste do cloreto de bário;
 - 7) determinar a concentração de proteína por refratometria*

* Atago Serum Refractometer. ATAGO OPTICAL WORKS CO. Ltd. Japan.

4.2.2. Preparo da anti-gamaglobulina suína

A imunização dos coelhos com a gamaglobulina suína, obedeceu, basicamente, a técnica de BENACERRAF & cols. (1963), envolvendo as seguintes etapas:

- 1) ressuspender a gamaglobulina suína em salina a 0.85% e na concentração a 1%;
- 2) emulsionar com igual volume de adjuvante completo de Freund*;
- 3) inocular 2 ml da mistura em coelhos de 60 dias, sendo 0.8 ml em cada pata posterior e 0.4 ml pela via subcutânea;
- 4) reinocular, duas semanas após, por via intradérmica, quatro locais do animal com 0.1 ml da gamaglobulina suína. Repetir esta operação a cada sete dias até que apareça reação local do tipo Arthus;
- 5) fazer avaliações periódicas dos anticorpos anti-suíno por meio da imunodifusão; título igual ou maior do que 1:20 foi considerado satisfatório;

* Difco Laboratories - Detroit 1, Michigan - U.S.A.

6) constatada a presença de anticorpos anti-suíno, proceder a sangria total dos coelhos para obtenção do soro;

4.2.3. Preparação do conjugado anti-gamaglobulina suína

O conjugado anti-suíno foi elaborado de acordo com a técnica de RIGGS (1970), destacando-se os seguintes aspectos:

4.2.3.1. Preparo da coluna DEAE-celulose

- 1) Pesar 10 gramas de DEAE-celulose* e lavar em solução a 0.5M de hidróxido de sódio. Esta operação é realizada em agitação magnética, durante 15 minutos e repetida por três vezes;
- 2) seguindo todo o processamento anterior, lavar o DEAE-celulose com água destilada;
- 3) novas lavagens da substância são realizadas em tampão fosfato mono-básico a 0.5M, durante três vezes;
- 4) finalmente, lava-se o DEAE-celulose em tampão fosfato 0.0175M até alcançar pH 6.3;

* Cellex-D, Bes Rad Laboratories, California - USA.

- 5) monta-se a coluna de DEAE-celulose, observando-se a proporção de 3 cm de altura preenchida pela substância para cada mililitro do soro. Esta coluna é lavada com tampão 0.175M, completada com esta mesma solução e guardada em geladeira.

4.2.3.2. Conjugação da anti-gamaglobulina suína

- 1) Medir a concentração de proteína total do soro anti-suíno;
- 2) colocar o soro num Erlenmeyer de 50 ml e levar à agitação magnética, na temperatura de 40°C;
- 3) adicionar, gota a gota, 10% de tampão carbonato bicarbonato pH 9;
- 4) adicionar lentamente, o isotiocianato de fluoresceína, observando-se a proporção de 1 mg desta substância para 40 mg de proteína total do soro;
- 5) deixar em conjugação, sob agitação magnética, durante 12 horas;
- 6) retirar o tampão da coluna DEAE-celulose e, imediatamente, adicionar o conjugado;
- 7) colher o conjugado em pequenas frações;
- 8) dialisar;
- 9) titular.

A titulação do conjugado e todas as fases de diagnóstico pela imunofluorescência, foram realizadas em microscópio Zeiss, binocular, Standard WL, objetiva de imersão 40 X, provido de diafragma, ocular 10 X, condensador de campo escuro, filtro excitador UG-2, filtros barreiras 0/41 e iluminação com lâmpada de mercúrio HBO - 200.

4.2.4. Método de imunofluorescência indireta

Utilizou-se a técnica de IFI descrita por VOGT (1969), consistindo das seguintes fases:

- 1) preparo de lâminas - a partir de cérebro de camundongos infectados com VDA, foram feitas duas impressões por lâmina;
- 2) deixar secar em temperatura ambiente durante 10 minutos;
- 3) fixar com acetona a -15°C durante 30 minutos;
- 4) fazer a demarcação das impressões com esmalte branco não cintilante;
- 5) diluir o conjugado em suspensão a 20% de cérebro de camundongo normal e deixar em geladeira durante uma hora para completa adsorção;
- 6) cobrir as impressões com soro a testar;

- 7) colocar em estufa a 37°C durante 30 minutos e em câmara úmida;
- 8) lavar rapidamente em salina tamponada pH 7.2 e repetir esta operação por 10 minutos;
- 9) enxaguar rapidamente em água destilada;
- 10) deixar secar e cobrir as impressões com o conjugado;
- 11) levar à estufa à 37°C durante 30 minutos;
- 12) lavar em salina pH 7.2, rapidamente e durante 10 minutos;
- 13) enxaguar em água destilada;
- 14) montar em lâmina e lamínula com glicerina tamponada pH 7.2;
- 15) Interpretação:

POSITIVO - visualização ao microscópio do complexo antígeno-anticorpo fluorescente.

NEGATIVO - ausência de fluorescência específica.

A IFI foi utilizada no levantamento sorológico observando-se os mesmos critérios adotados na SN.

QUADRO I

Amostras de soros suínos colhidos em matadouro de Belo Horizonte e propriedades do Estado de Minas Gerais, 1974/75

Município	Total de amostras	Colheita em		Número de amostras examinadas	
		Mata-douro	Criação	Em "pool"	Individualmente
Araxá	13	13	-	10	3
Belo Horizonte	8	-	8	-	8
Betim	18	18	-	15	6
Conceição do Alagoas	30	30	-	25	6
Contagem	20	3	17	5	15
Carmo do Paranaíba	24	24	-	15	9
Corinto	26	26	-	20	6
Coromandel	38	38	-	30	14
Cruzeiro da Fortaleza	18	18	-	15	6
Entre Rios de Minas	16	16	-	15	3
Esmeraldas	32	32	-	30	6
Felixlândia	31	10	21	25	6
Formiga	26	26	-	20	6
Governador Valadares	33	-	33	20	18
Guapê	16	16	-	15	6
Igarapé	31	-	31	35	6
Ituiutaba	51	51	-	35	16
Jequereí	16	16	-	15	3
João Pinheiro	16	16	-	10	6
José de Melo	16	16	-	15	3
Lagoa Formosa	20	20	-	15	6
Lagoa Santa	7	-	7	-	7
Luz	14	14	-	10	6
Pains	20	20	-	20	3
Patos de Minas	154	22	132	140	33
Ponte Nova	16	16	-	15	3
Ribeirão das Neves	8	8	-	5	3
Santa Luzia	16	11	5	10	6
São Pedro do Suassuí	25	25	-	20	9
Santa Vitória	35	35	-	40	4
Vespasiano	16	16	-	15	3
Total	810	556	254	660	235

1. Padronização das técnicas de soroneutralização e imunofluorescência indireta

1.1. Soroneutralização

No Quadro II são mostrados os resultados do experimento executado com soro de coelhos. As soroneutralizações realizadas em temperatura ambiente, durante 30 e 90 minutos apresentaram títulos inferiores a $10^{-1.0}DL_{50}$. À temperatura de 37°C, durante 90 minutos o título foi obtido de 1/14.8 DL_{50} sendo este o melhor resultado conseguido nos trabalhos com soro de coelhos.

As amostras de imunossoros apresentaram títulos neutralizantes cuja amplitude variou entre 1:30 a 1:110. Os cinco imunossoros testados apresentaram os seguintes títulos: 1:56, 1:46, 1:30, 1:50 e 1:110, respectivamente, para os soros A, B, C, D e E. O tempo de morte de cinquenta por cento (t_{50}) dos camundongos ocorreu entre os quarto e quinto dias de inoculação, coincidindo sempre com o total de mortalidade dos animais, naquela dilui-

ção. No Quadro III são apresentados o índice de mortalidade por diluição, o t_{50} dos camundongos inoculados e os títulos obtidos.

1.2. Imunofluorescência indireta

Os títulos encontrados na IFI foram de 1:40, 1:32, 1:20, 1:40 e 1:64, respectivamente, para os soros A, B, C, D e E.

Os resultados obtidos na IFI e SN com imunossoros são mostrados, comparativamente, no Quadro IV.

2. Levantamento sorológico

Todos os 132 "pools" examinados, contendo cinco soros cada, foram negativos à prova de SN. Estes resultados demonstraram que os 660 soros não possuem anticorpos anti-DA a uma diluição de 1:10.

Dos 235 soros examinados individualmente, somente 5 (2.1%) reagiram positivamente ao teste de SN sendo um com título 1:11, dois com título 1:5 e dois com título 1:2. Os soros positivos foram colhidos em Governador Valadares.

Todos os "pools" examinados foram negativos na IFI. As amostras de soros reagentes à SN apresentaram-se positivos na IFI, sendo dois soros com título

1:2, dois com título 1:4 e um com título 1:8.

No Quadro IV são mostrados, comparativamente, os títulos obtidos com soros estudados no levantamento sorológico.

QUADRO II

Títulos dos soros de coelhos vacinados e submetidos
ã SN com variação na temperatura e tempo de contato
soro-vírus

Número do Experimento	Incubação soro-vírus		Título
	Temperatura	Tempo	
1	ambiente	30'	$10^{-1.0}$
2	ambiente	90'	$10^{-1.0}$
3	37°C	90'	1/14.8

QUADRO III

Resultados da SN em camundongos de imunossoros anti-DA

Imunossoro	Diluição	Mortalidade			Título
		Nº	%	t ₅₀	
A	1:5	0/8	-	-	1:56
	1:25	2/8	25	-	
	1:125	6/8	75	40 dia	
B	1:5	0/8	-	-	1:46
	1:25	3/8	37,5	-	
	1:125	6/8	75	40 dia	
C	1:5	0/8	-	-	1:30
	1:25	4/8	50	50 dia	
	1:125	7/8	87,5	40 dia	
D	1:5	0/8	-	-	1:55
	1:25	3/8	37,5	-	
	1:125	5/8	62,5	50 dia	
E	1:5	0/8	-	-	1:110
	1:25	1/8	12,5	-	
	1:125	4/8	50	50 dia	

QUADRO IV

Comparação entre os títulos da SN e IFI em imunossoro
e soros a testar

	Títulos	
	SN	IFI
a) Imunossoros		
A	1:56	1:40
B	1:46	1:32
C	1:30	1:20
D	1:50	1:40
E	1:110	1:64
b) Soros a testar		
1	1:11	1:8
2	1:5	1:4
3	1:5	1:4
4	1:2	1:2
5	1:2	1:2

O estudo da SN mostrou boa sensibilidade dos camundongos ao método, porém, a idade dos animais, a adaptação e a conservação da amostra são fatores que parecem influenciar no funcionamento da técnica. Superadas estas limitações, pode-se confiar plenamente na veracidade dos resultados, alcançados pela SN. Estes achados coincidem com as observações feitas por SHOPE (1931), KOJONOK & CRECZI (1956) e FRASER & RAMACHANDRAN (1969), que revelaram a importância do camundongo no isolamento e identificação do vírus. Em seus trabalhos sobre VDA em animais de laboratório, os autores verificaram que camundongo jovem é bastante sensível à prova de SN, apresentando resultados comparáveis à cultura de tecido, quando trabalhados com até uma semana de idade.

A IFI é, possivelmente, a forma mais simples de detectar anticorpos. O problema das lâminas positivas não apresentarem VDA, citado por JENTSCH (1968) pode ser comprovado nesta pesquisa, contudo, a sensibilidade do método aumenta quando são usadas impressões fei-

tas com cérebro de camundongo que mostrou quadro clínico completo da doença.

Neste trabalho procurou-se correlacionar os títulos obtidos pela IFI e SN, guardando-se a característica intrínseca a cada um dos métodos; na IFI o título é dado pela visualização do complexo fluorescente antígeno-anticorpo da mais alta diluição examinada, enquanto que na SN, o título é expresso em função do logarítmo da diluição do vírus. Desta forma, os resultados conseguidos pela prova de SN estão de acordo com o esperado pois são os anticorpos neutralizantes aqueles que atingem níveis mais altos e que se mantêm estáveis durante mais tempo, havendo também, uma relação inversa entre o número de doses letais empregadas e o título obtido.

Os menores títulos obtidos pela IFI se deve, possivelmente, ao fato deste método depender, essencialmente, da quantidade de vírus existente na impressão. Entretanto, a rapidez e eficiência da técnica em baixas diluições são fatores a considerar quando a pesquisa se referir apenas à identificação da infecção.

Para se trabalhar com maior número de amostras, o levantamento sorológico foi inicialmente reali-

zado em "pools" de cinco soros. Esta fase teve como base a pesquisa de BURROWS (1963) que trabalhou com soros de 58 porcos e 120 varrões, tendo na diluição 1:10, detectado anticorpos em 26% dos porcos e 56% dos varrões. Provavelmente este autor conseguiu detectar anticorpos por ter trabalhado com soros de suínos que tiveram contato com focos da DA o que não se constatou na presente pesquisa.

Numa segunda etapa, trabalhou-se com soros diluídos a partir de 1:2, pois acreditou-se que o fator diluição 1:10 tenha sido responsável pela alta negatividade encontrada. Esta nova orientação está de acordo com outras pesquisas que objetivaram medir sorologicamente a extensão da doença. O índice de 2.1% de infecção em suínos revela que, de certa forma, a DA é pouco comum no Estado de Minas Gerais. Entretanto, esta pesquisa abrangeu somente algumas regiões do Estado e a colheita do material foi realizada em época que não se constatou nenhum foco da doença. Assim, pode-se correlacionar estes resultados aos obtidos por outros autores:

MACKAY & cols. (1962) estudando um foco da DA verificou que 60 de 72 amostras colhidas foram posi-

tivas na diluição 1:2 e 593 suínos de regiões próximas ao surto apresentaram-se negativos ao teste.

HOWARTH (1969) realizou pesquisa sobre a prevalência da infecção em suínos da Califórnia. Animais de sete dos nove ranchos estudados apresentaram anticorpos neutralizantes e dos 680 soros testados, a uma diluição 1:4, observou-se a presença de infecção em 29% dos rebanhos. Este total foi conseguido em períodos estacionais correspondentes ao início do inverno e do verão. No entanto, durante três anos ocorreu surto da DA, diagnosticado por HOWARTH & PAOLI (1969).

BUNN (1975) em trabalho sobre incidência da infecção pelo VDA em suínos de Illinois, observou 4.25% de positividade, em diluição a partir de 1:4, numa região em que a doença nunca foi reportada. O resultado alcançado não pode ser explicado pelo autor que sugeriu a falta de assistência aos rebanhos como fator responsável pela ausência de dados sobre a doença.

O manejo mais adequado adotado nas criações de suínos e a pequena amostragem utilizada são fatores que poderão ter influído nos baixos níveis da infecção obtidos neste trabalho. Porém, observando os resultados conseguidos nas diferentes fases do levantamento, bem

como nos trabalhos dos diversos autores consultados, verifica-se que a infecção pelo VDA está presente em baixos níveis de anticorpos nos rebanhos suínos.

Resultados positivos encontrados nas amostras colhidas em criações, parece estar relacionado com o fator idade. Os animais de matadouros geralmente estão na faixa dos seis meses de idade enquanto que os de criações utilizados neste levantamento, foram matrizes e varrões e que, por serem mais velhos, tiveram maiores chances de se infectarem. CARNEIRO (1939) e BURROWS (1963) enfatizam a presença da infecção em porcos, durante longo período de vida, porém, esta possibilidade só deverá ocorrer em regiões onde exista foco da DA.

1. A IFI tem sensibilidade relativa à SN na identificação de anticorpos anti-DA;
2. Os valores obtidos na SN guardam correspondência com os títulos encontrados na IFI;
3. Títulos iguais ou mais altos de anticorpos foram obtidos na SN;
4. A diferença proporcional entre os valores encontrados na SN e IFI, tende a aumentar à medida que os soros apresentam maiores quantidades de anticorpos;
5. A DA se mantém em baixos níveis no Estado de Minas Gerais. Resultados mais efetivos sobre a infecção poderão ser obtidos em trabalho com amostragem mais significativa e, também, de regiões onde tenham ocorrido casos da doença.

7. Resumo

Foram estudadas para presença de anticorpos anti-DA, pelos métodos da SN em camundongo e IFI, comparativamente, 810 amostras de soros de suínos sendo 556 obtidas em matadouros e 254 em criações, provenientes de 31 municípios do Estado de Minas Gerais.

Um total de 660 amostras foram estudadas sob forma de "pool" de cinco soros e não revelaram anticorpos em nenhum dos métodos. Das 235 amostras examinadas individualmente, 5 (2.1%) foram positivas, apresentando títulos que variaram de 1:2 a 1:11 na SN e de 1:2 a 1:8 na IFI:

Na padronização da SN e da IFI foram utilizados soros de sete coelhos vacinados com vacina experimental inativada com betapropiolactona e cinco soros hiperimunes de origem suína. Os anticorpos nos soros de coelhos foram titulados pela SN sendo submetidos a três diferentes temperaturas e tempos de incubação. À temperatura de 37°C, durante 90 minutos o título foi de 1/14.8 DL₅₀ tendo sido considerado o melhor resultado obtido.

Os imunossoros de origem suína foram titulados pelos métodos de SN e IFI. Todos os soros titulados reagiram positivamente em ambas as provas. Os títulos mais altos foram conseguidos na SN, cuja amplitude variou de 1:30 a 1:110. Na IFI os títulos variaram entre 1:20 a 1:64.

A study of 810 samples of pigs serum were analysed for antibodies against Ajueszky Disease (AD), utilizing serum-neutralization (SN) in mouse and Indirect Fluorescent Antibody (IFI) Technic. Of the total samples ⁵⁵⁶ 856 were from a slaughterhouse and 254 from pigs farms, of 31 counties in the State of Minas Gerais, Brazil.

A total of 660 samples analyzed as a "pool" of five serums, by both methods (SN-IFI), this not demonstrated any antibodies against AD. From 235 serum-samples analyzed, only 5 (2.1%) were positive, with titles of 1:2 to 1:11 for SN and 1:2 to 1:8 for IFI:

Hyperimmune serum from five pigs and seven rabbits previously immunized with inactivated virus (betapropiolactone) of an experimental vaccine were utilized for standard SN and IFI technics.

Neutralization of antibodies titer of rabbits serum, were determined by three different temperatures and incubation time. At 37°C and 90 minutes, tittle of

1/14.8 DL₅₀ were obtained, and this considered the best results.

Hyperimmune serum of swine origin were titer by SN and IFI, serum titer were positive by both methods. The higher titers were seen in SN from 1:30 to 1:110 and for IFI titers were 1:20 to 1:64.

- AKKERMANS, J.P.W.M. La maladie d'Aujeszky aux Holande. Cah.Méd.Vet., Paris, 43(5):205-8, 1974.
- ALBRECHT, P.; BLASKOVIC, D.; JAKUBIK, J.; LESSO, J. Demonstration of pseudorabies virus in chick embryo cell cultures and infected animals by the fluorescent antibody technique. Acta Virol., Praga, 14:289-96, 1963.
- AUJESZKY, A. Centr. Bakt., 32:353, 1902. In: LAUTIE, R. La maladie d'Aujeszky. S.l., Expansion Scientifique Française. 1969. 226 p.
- BENACERRAF, B.; OVARY, A.; BLOCK, K.L.; FRANKLIN, E.C. Properties of guinea pig antibodies. J.Exp.Med., New York, 117:937-49, 1963.
- BITSCH, V. La maladie d'Aujeszky au Denemark. Cah. Vét.Méd., Paris, 43(5):211-9, 1974.
- BORGEN, H.C. & BENEDIXEN, H.S. The incidence of pseudorabies infectious in cattle and swine in Deanmark. Nord.Vet.Med., Kobenhavn, 17:672-9, 1965.

- BUNN, C.; MCKERCHER, D.G.; STARREY, A.L.; WADA, E.M.
Prevalence of pseudorabies in sows in central
Illinois. J.A.V.M.A., Schaumburg, 167(3):229-30, 1975.
- BURROWS, R. (1963). Proc. XVII Int. Vet. Congress,
Hanover, apud BURROWS, R. Aujeszky's disease
virus. Vet.Rec., London, 78(22):769-70, 1966.
- CARNEIRO, V. Anticorpos neutralizantes do vírus da
doença de Aujeszky em soros de porcos no Brasil.
Arq.Inst.Biol., São Paulo, 10:305-12, 1939.
- CARNEIRO, V. A doença de Aujeszky em suínos no Brasil,
nos focos de epizootias em bovinos, pela pesquisa de
anticorpos neutralizantes do vírus. Arq.Inst.Biol.,
São Paulo, 12:243-81, 1941.
- COMBAIRE, C. La maladie d'Aujeszky en Espagne. Cah.
Méd.Vét., Paris, 43(5):220-4, 1974.
- FOMIN, J.V. Trudy Nauch.Inst.Vet.Preparatov., 13:54.
1966 apud SERRA, A. & MANIOVANI, G. La diagnosi di
malattia di Aujeszky per mezzo degli anticorpi fluo-
rescenti. Annali Fac.Med.Vet., Torino, 17:335-43, 1968.
- FRASER, G. & RAMACHANDRAN, P.S. Studies on the virus
of Aujeszky's Disease. I. Pathogenicity for rats
and mice. J.Comp.Path., Edinburgh, 79:435-44, 1969.

- GRUNNERT, Z. & ZUFFA, A. La maladie d'Aujeszky en Tchechoslovaquie. Cah.Méd.Vét., Paris, 43(5):280-6, 1974.
- HIPÓLITO, O.; JUNIOR, J.A.B.; SILVA, J.M.L.; LIMA, S.N. A doença de Aujeszky em suínos em Minas Gerais. Arq. Esc.Vet.UFMG, Belo Horizonte, 13:16-7, 1960.
- HOWARTH, J.A. A serological study of pseudorabies in swine. J.A.V.M.A., Schaumburg, 154(12):1583-9, 1969.
- HOWARTH, J.A. & PAOLI, A. A enzootic of pseudorabies in swine in California. J.A.V.M.A., Schaumburg, 152(8):1114-8, 1968.
- JENSTZCH, K.D. Problems concerning the preparation of immune serum for the fluorescence-serological demonstration of herpesvirus suis. Arch.Exp.Vet., 22:1176-84, 1968 apud Vet.Bull., Weybridge, 39(7): 2888, 1969.
- JOHNSTON; J.B. & WITTRICA, D.A. An outbreak of Aujeszky disease. Vet.Rec., London, 73(34):818-21, 1961.
- KOJONOK, J. Maladie d'Aujeszky en Hongrie. Cah.Méd.Vet., Paris, 43(5):240-7, 1974.
- KOJONOK, J. & CRÉCZI, E. Serum against Aujeszky's disease in sucking pigs. Acta Vet., Budapest, 7(4): 423-7, 1956.

- KOPROWSKI, M. & JOHNSON, H.N. Prueba de inoculation in ratones. In: D'ANTONA, D. Tecnicas de laboratorio aplicada a la rabia. Organizaci3n Mundial de la Salud. 1959. p. 57-75. (S3rie Monografias).
- LEUNEN, J.; NEURICHY, W.; PENZAERT, M. La maladie d'Aujeszky en Belgique. Cah.M3d.V3t., Paris, 43(5): 205-8, 1974.
- LODETTI, E. & LODRINI, E. La maladie d'Aujeszky en Italie. Cah.M3d.V3t., Paris, 43(5):250-3, 1974.
- MACKAY, R.R.; DONE, J.T.; BURROWS, R. An outbreak of Aujeszky's disease in pigs in Lincolnshire. Vet.Rec., London, 74(24):669-75, 1962.
- MEYLING, A. & BITSCH, V. The diagnosis of pseudorabies by the fluorescent antibody technique. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 8:360-8, 1967.
- REIS, R. Doen7a de Aujeszky. In: _____. Apontamentos de Doen7as Infecto-contagiosas. Belo Horizonte, Escola de Veterin3ria, 1973. p. 1. (Mimeografado).
- REIS, R. Fracionamento da globulinas do soro com sulfato de am3nio. In: _____. Imunologia Aplicada. Belo Horizonte, Escola de Veterin3ria, 1973. p. 15-20. (Mimeografado)

- REED, L. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. An.J.Hyg., Baltimore, 27 (3):493-7, 1938.
- RIGGS, G. Imunofluorescência. In: LIMA, A. & SILVA, W. D. Imunologia, Imunopatologia, Alergia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970. p. 167.
- SABŐ, A. & RAJACANI, J. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease by the fluorescent antibody technique. Acta Virol., Praga, 14:475-84, 1970.
- SERRA, A. & MANIOVANI, G. La diagnosi di malattia di Aujeszky per mezzo degli anticorpi fluorescenti. Annali Fac.Med.Vet., Torino, 17:335-43, 1968.
- SHOPE, R.E. An experimental study "mad itch" with special reference to its relationship to pseudorabies. J.Exp.Med., Baltimore, 54(2):233-48, 1931.
- SILVA, R.A. & GIOVINI, N. Novos focos da doença de Aujeszky no Estado de Minas Gerais. IV. Transmissão placentária do vírus de Aujeszky na doença natural em bovino. Pesq.Agropec.Bras., Rio de Janeiro, 1: 71-2, 1966.
- STEWART, W.C.; CARBREY, E.A.; KRESSE, S.I. Detection of pseudorabies virus by immunofluorescence. J.A.V. M.A., Schaumburg, 15:747-51, 1967.

- SVOBODOVÁ, J. & SABO, A. The use of immunofluorescent method in establishing the percent of infected cells in calf kidney cell cultures persistently infected with Aujeszky's virus. Vet.Cas., Bratislava, 13:79-83, 1970.
- TOMA, B.; GORET, P.; BENET, J.J. Étude epidemiological de la maladie d'Aujeszky en France par recherche des anticorps neutralizants. Journ.Rech.Porcine France, 12:29-35, 1974 apud TOMA, B. Cah.Méd.Vét., Paris, 43(5):205-8, 1974.
- VOGT, P.K. Immunofluorescent detection of viral antigens. In: HABEL, K. & SALZMAN, N.P. Fundamental techniques in virology. New York, Academic Press,