

MARA ELIZA GASINO JOINEAU

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO
UTILIZADAS COMO APOIO AO PROGRAMA
DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA PESTE
SUÍNA CLÁSSICA NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Área de Concentração em Patologia Veterinária) da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Metry Bacila

Co-orientadores:

Prof.^a Rosângela Locatelli Dittrich

Prof. Yasuyoshi Hayashi

CURITIBA

2000

Dedico todo o meu trabalho aos grandes amores da minha vida, minhas filhas, minha mãe, meu marido, meus sogros e à toda minha grande família.

Dedico ao meu pai (*In memoriam*), com quase dois anos de saudade, pelo orgulho que sempre demonstrou a cada conquista que alcancei.



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese da Candidata ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **MARA ELIZA GASINO JOINEAU** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADAS COMO APOIO AO PROGRAMA DE CONTROLE E ERRADICAÇÃO DA PESTE SUÍNA CLASSICA NO ESTADO DO PARANÁ”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) A Candidata se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pela Candidata, atribuiu o conceito “ A ” concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Veterinária.

Curitiba, 24 de agosto de 2000.


Prof. Dr. METRY BACILA
Presidente/Orientador


Prof. Dr. JORGE A. GUIANTES
Membro


Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL
Membro

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Metry Bacila, querido mestre, agradeço pela dedicação de seu valioso tempo, que só aumentou a admiração e carinho que lhe tenho.

À Professora Rosângela Locatelli Dittrich, pela sua grande amizade e orientação.

Ao Professor Yasuyoshi Hayashi, pelos ensinamentos ao longo deste trabalho.

À grande amiga Rosária Richartz, pelos anos dedicados em compartilhar toda a sua experiência profissional.

À minha amiga Maria A. de Carvalho Patrício, pela paciência, dedicação e incentivo.

Ao meu querido amigo André Ostrensky, por todas as horas de atenção dispensadas

Ao Jurandir Cabral, por sua capacidade e eficiência, que torna possível o trabalho diário no laboratório de virologia do CDME.

À chefia do Centro de Diagnóstico “Marcos Enriretti” pelo apoio incondicional para a realização deste trabalho e a todos os amigos do laboratório.

Dentre os amigos do CDME devo agradecer especialmente ao Ernesto Krüger, Milton Guedes, Iara Sacks e à Cristina B. Arrua.

A todos os colegas do Departamento de Fiscalização da SEAB, pelo trabalho desenvolvido em prol da pecuária paranaense.

Ao Prof. Geraldo C. Alberton pela orientação na conclusão deste trabalho.

Agradecimento especial ao Dr. Marinus Bloemraad, pelo suporte técnico, tanto em termos de material didático, como em insumos para a realização deste estudo, e acima de tudo pela sua grande amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVO GERAL.....	7
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1. DEFINIÇÃO.....	9
2.2. ETIOLOGIA.....	11
2.3. EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.4. PATOGENIA.....	17
2.5. SINAIS CLÍNICOS.....	19
2.6. DIAGNÓSTICO.....	21
2.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	21
2.6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	23
2.6.2.a. Detecção do antígeno viral.....	24
2.6.2.b. Detecção de anticorpos.....	26

2.6.3.	CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1.	AMOSTRAS	30
3.1.1.	AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ÓRGÃOS	30
3.1.2	AMOSTRAS DE SORO SANGÜÍNEO	31
3.2.	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA	33
3.3.	VIRUSNEUTRALIZAÇÃO – NPLA (NEUTRALIZING PEROXIDASE-LINKED ASSAY)	35
3.3.1.	VIRUSNEUTRALIZAÇÃO PARA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (NPLA)	36
3.3.1.a.	Cultivo celular	37
3.3.1.b.	Amostra viral padrão do laboratório	38
3.3.1.c	Neutralização viral	41
3.3.2.	VIRUSNEUTRALIZAÇÃO PARA DIARRÉIA BOVINA VIRAL (NPLA)	42
3.4.	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)	42
3.5.	IMUNOPEROXIDASE INDIRETA (IPX)	43
3.6.	ISOLAMENTO VIRAL	44
3.7.	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	DETECÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL	46
4.2.	DETECÇÃO DE ANTICORPOS	52
4.2.1.	ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE ELISA E VIRUSNEUTRALIZAÇÃO (NPLA) EM ANIMAIS VACINADOS	52
4.2.2.	RESULTADOS DE ANÁLISES SOROLÓGICAS PELA TÉCNICA DE ELISA NO REBANHO SUÍNO DO ESTADO DO PARANÁ	61
5.	DISCUSSÃO	63

5.1.	DETECÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL.....	63
5.2.	DETECÇÃO DE ANTICORPOS.....	66
5.2.1.	ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE ELISA E VIRUSNEUTRALIZAÇÃO (NPLA) EM ANIMAIS VACINADOS.....	66
5.2.2.	RESULTADOS DE ANÁLISES SOROLÓGICAS PELA TÉCNICA DE ELISA NO REBANHO SUÍNO DO ESTADO DO PARANÁ	69
6.	CONCLUSÕES.....	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE FIGURAS

1 - Estado do Paraná , divisão das áreas I e II para o Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica (Brasil, 1992b).....	4
2 - Regiões do Estado do Paraná onde foram realizadas as colheitas de material para a vigilância epidemiológica do foco de Peste Suína Clássica em 1997.....	32
3 - Epitélio das criptas da tonsila de um animal positivo para detecção de antígeno da Peste Suína Clássica por imunofluorescência.....	48
4 - Monocamada celular da linhagem PK15 infectada com o vírus da Peste Suína Clássica, fixada pelo calor e marcada pela imunoperoxidase (Microscópio invertido 400 X).....	48
5 - Monocamada celular da linhagem PK 15 durante o processo de tripsinização.....	49
6 - Total de animais positivos na detecção de anticorpos contra o vírus da Peste Suína Clássica agrupados conforme os títulos de anticorpos neutralizantes encontrados na técnica de virusneutralização.....	59
7 - Curva de regressão entre as percentagens de inibição na técnica de ELISA em relação ao título de anticorpos neutralizantes pela técnica de virusneutralização para Peste Suína Clássica.....	60

LISTA DE TABELAS

1 -	Segurança do teste (sensibilidade e especificidade) e valor preditivo de um diagnóstico (OIE, 2000).....	29
2 -	Detecção de antígeno viral e de anticorpos em amostras de sete animais oriundas do foco de Peste Suína Clássica em outubro de 1997, em São Pedro do Iguaçu, Paraná, Brasil.....	47
3 -	Detecção de antígeno em amostras de fragmentos de órgãos de suínos recebidas e analisadas durante o foco de Peste Suína Clássica em 1997 e após dois anos.....	50
4 -	Comparação entre as técnicas de ELISA e isolamento viral em cultivo celular, para detecção de antígeno em sete animais provenientes do foco de Peste Suína Clássica em 1997, em São Pedro do Iguaçu, Paraná, Brasil.....	51
5 -	Base para cálculos comparativos entre virusneutralização e ELISA, de especificidade e sensibilidade relativas, e dos valores preditivos negativo e positivo (OIE, 2000).....	52

6 -	Comparação dos resultados obtidos pela técnica de ELISA (amostras sem repetição) e virusneutralização para Peste Suína Clássica.....	54
7 -	Comparação dos resultados obtidos pela técnica de ELISA (amostras em duplicata) e virusneutralização para Peste Suína Clássica.....	55
8 -	Amostras positivas para Peste Suína Clássica na virusneutralização e negativas na técnica de ELISA (Falsos negativos).....	56
9 -	Amostras negativas para Peste Suína Clássica na virusneutralização e positivas na técnica de ELISA (Falsos positivos),e diagnóstico diferencial para Diarréia Bovina Viral (BVD).....	57
10 -	Reações cruzadas entre as técnicas de virusneutralização (NPLA) para Peste Suína Clássica (PSC) e Diarréia Bovina Viral (BVD).....	57
11 -	Soros positivos agrupados conforme o título de anticorpos neutralizantes para o vírus da Peste Suína Clássica.....	58
12 -	Sorologia do Estado do Paraná pelas técnicas de ELISA policlonal e monoclonal para detecção de anticorpos contra o vírus da Peste Suína Clássica (1997-2000).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

BD – Border Disease ou Doença da Fronteira

BDV – Vírus da Doença da Fronteira

BHI – Brain Heart Infusion

BVD – Diarréia Bovina Viral

BVDV – Vírus da Diarréia Bovina Viral

CDME – Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”

CSFV – Classical Swine Fever Virus ou Vírus da Peste Suína Clássica

DMSO – Dimetil Sulfoxido

DT – Diluição de trabalho

EEC – Comunidade Económica Européia

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FN – Falso negativo

FP – Falso positivo

GSMD – Granja de suínos com mínimo de doenças

HRPO – Horse Radish Peroxidase

IFD – Imunofluorescência direta

IFI – Imunofluorescência indireta

IPX - Imunoperoxidase

Kb – Quilo bases

MDBK – Madin Darby Bovine Kidney

MEM – Minimum Essential Media

NIFT – Neutralizing immunofluorescence test

NPLA – Neutralizing Peroxidase Linked Assay ou Neutralização com revelação por imunoperoxidase

OIE – Office International des Epizooties

PBS – Solução tampão de fosfato

PK15 – Porcine Kidney

PSC – Peste Suína Clássica

PSCV ou CSFV – Vírus da Peste Suína Clássica

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento

SFB – Soro fetal bovino

TCID₅₀ – Dose capaz de infectar 50% dos cultivos celulares

TMB – Tetrametil benzidina

TPB – Caldo triptose fosfato

VP – Verdadeiro positivo

VN – Verdadeiro negativo

VPSC – Vírus da Peste Suína Clássica

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as técnicas de diagnóstico utilizadas como apoio ao Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica (PSC) no Estado do Paraná. Refere-se ao isolamento de uma cepa de moderada virulência do vírus Peste Suína Clássica a partir de fragmentos de órgãos provenientes de granjas de suínos no município de São Pedro do Iguaçu e, à análise de 36.507 amostras de soro sanguíneo de suínos do rebanho do Estado do Paraná colhidas para a vigilância sanitária no período compreendido entre março de 1997 e junho de 2000; incluindo ainda amostras de uma granja de reprodução com vacinação clandestina. As técnicas empregadas para detecção de antígeno foram imunofluorescência e imunoperoxidase indiretas em cortes histológicos e ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de antígeno, bem como isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK15 (Porcine Kidney, *Sus scrofa*). Para a detecção de anticorpos contra o vírus da PSC foram utilizadas as técnicas de virusneutralização com revelação por imunoperoxidase e um "kit" de ELISA monoclonal, e ainda virusneutralização para diarreia bovina viral, como diagnóstico diferencial. Para detecção de antígeno, a técnica de ELISA apresentou melhores resultados do que o isolamento viral, quando as condições de conservação da amostra comprometiam a viabilidade do vírus para a replicação. Para a detecção de anticorpos, a concordância dos resultados entre a técnica de ELISA e a de virusneutralização (prova de referência) foi de 98,26%, e os valores relativos de sensibilidade e especificidade foram 94,87 e 99,41% respectivamente.

ABSTRACT

The present research's objective was the valuation of the laboratory methods for diagnoses used to assist the Control and Eradication Program of Classical Swine Fever (CSF) in the state of Paraná, Brazil. It refers to the isolation of a moderated virulence strain of Classical Swine Fever Vírus from fragments of swine organs from farms of São Pedro do Iguaçu and the analysis of 36,507 samples of swine blood serum from the state of Paraná, harvested for sanitary vigilance purposes, from march 1997 to june 2000, including samples from a reproduction farm with a non authorised vaccination. Laboratory methods to detect the viral antigen comprised Immunofluorescent test (IFT) and Immunoperoxidase test (IPT) on cryostat made histological sections and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), as well as viral isolation performed by culture of PK15 cells lineage (Porcine Kidney, *Sus Scrofa*). The methods used to detect antibodies against the Classical Swine Fever Virus were: Neutralizing Peroxidase Linked Assay (NPLA) and a monoclonal ELISA, and Bovine Diarrhoea NPLA as differential diagnoses. To detect the viral antigen, ELISA method presented better results than the viral isolation, when the conservation conditions of the sample compromised the viability of the virus for replication. To detect the antibodies, the conformity of results between the ELISA method and the NPLA method (reference test) was 98.26% and the relative values of sensitivity and specificity were 94,87 and 99.41%, respectively.

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura no Estado do Paraná tem evoluído de forma constante tanto em número de animais, o que pode ser traduzido em importância econômica no setor agro-industrial, bem como em termos técnicos, o que demonstra a aptidão em produzir carne suína com custos competitivos nos âmbitos nacional e internacional.

O Estado do Paraná possui um rebanho suíno de cerca de 4.175.000 cabeças, das quais 2.990.000 representadas pelo rebanho industrial. A região de maior concentração é a do sudoeste do Estado, onde se encontra a maior parte das granjas GSMD (Granjas de Suínos com Mínimo de Doenças) que são submetidas à recertificação semestral, tendo como rotina a monitorização sorológica para brucelose, doença de Aujeszky, peste suína clássica e leptospirose, esta última quando não se utiliza a vacinação. O Estado do Paraná possui um total de 126.000 propriedades suinícolas, das quais 30.000 são consideradas industriais. As granjas consideradas GSMD no Estado do Paraná totalizam quarenta e três, representando portanto 0,14% do número total de propriedades industriais. A produção anual de carne suína do Estado do Paraná é de

309.800 ton., sendo que 267.900 ton. correspondem ao rebanho industrial (PARANÁ, 1999).

Acompanhando o crescimento da suinocultura no Estado, vem as exigências do mercado consumidor de carne de alta qualidade, proveniente de rebanhos com adequado controle sanitário. Para tanto, foram criados programas de controle e erradicação das enfermidades de maior importância na produção de suínos.

A Peste Suína Clássica (PSC), figura como a primeira barreira à comercialização de suínos para países livres ou em fase de erradicação da doença e, inclusive, entre alguns estados brasileiros que já se encontram em etapa final do programa de erradicação.

A PSC é uma enfermidade viral que acomete somente suídeos, causando grandes perdas econômicas por apresentar alta morbidade e mortalidade, podendo chegar a 100% no rebanho atingido. A doença é causada por um vírus do gênero *Pestivirus* pertencente à família *Flaviviridae* (WENGLER, 1991).

A primeira notificação desta doença ocorreu em 1830 em Ohio, Estados Unidos. Atualmente a PSC apresenta distribuição mundial. Nas últimas décadas alguns países, como por exemplo os Estados Unidos, o Canadá e a Inglaterra, têm tido sucesso na erradicação dessa virose. Nos países onde a PSC é enzoótica, a doença é de grande importância econômica (VAN OIRSCHOT & TERPSTRA, 1989).

Em 24 de janeiro de 1927, foi criado o "Office International des Epizooties" (OIE), com sede em Paris, do qual o Brasil é membro fundador, e cuja responsabilidade é disciplinar, no âmbito internacional, a regulamentação, a programação e a investigação de experiências sobre patologia e profilaxia das doenças animais, constituindo-se no

fórum máximo da Medicina Veterinária. A OIE edita o Código Zoosanitário Internacional que regulamenta todas as normas para trânsito, importação e exportação de animais e seus produtos, bem como as técnicas de diagnóstico e vacinas que devem ser utilizadas (BRASIL, 1980).

No Brasil, a primeira citação da ocorrência de PSC foi em Minas Gerais, em 1888, por Lacerda (BRASIL, 1980). Por um período relativamente longo não houve mais registros da sua ocorrência, até que em 1931 a doença foi relatada no Estado de São Paulo, permanecendo latente, sem ocasionar problemas significativos até 1939, quando se manifestou de forma particularmente virulenta. No Brasil, coube ao Instituto Biológico de São Paulo, após muitos esforços, a preparação da primeira vacina e de soro eficientes no combate à PSC (D'APICE, 1945 e SILVA, 1949).

A incidência de surtos graves de PSC fez-se sentir notadamente nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais em 1946, chegando finalmente ao Estado de São Paulo, no município de Ourinhos e, em seguida, Jacarezinho, no Norte do Paraná. A partir de então foi dado início ao programa oficial de controle desta enfermidade em todo o país (VALLE, 1951).

O Programa Nacional de Controle da Peste Suína Clássica, implantado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA) em 1946, baseou-se na vacinação, no controle de trânsito de animais e em outras medidas sanitárias (BRASIL, 1980).

Em 22 de janeiro de 1980, a Comunidade Econômica Européia, através da Diretiva do Conselho 80/217/ECC, introduziu as medidas comunitárias para o controle da PSC. Sendo assim, a presença da enfermidade no rebanho brasileiro criou barreiras ao comércio da carne suína para a Europa. A partir dessa data, a PSC passou a ser

controlada nos estados do sul do Brasil, por ser considerada a área de maior concentração de criatórios de suínos do País (BRASIL, 1992a).

Através da portaria 11/92 de 26 de março de 1992, da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (SNAD), foi baixada instrução normativa para o programa de controle e erradicação da PSC. O programa envolveu o aprimoramento do diagnóstico virológico e a implantação de métodos sorológicos (FREITAS, 1993). Dentro das estratégias de atuação, foram criadas áreas distintas nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina.

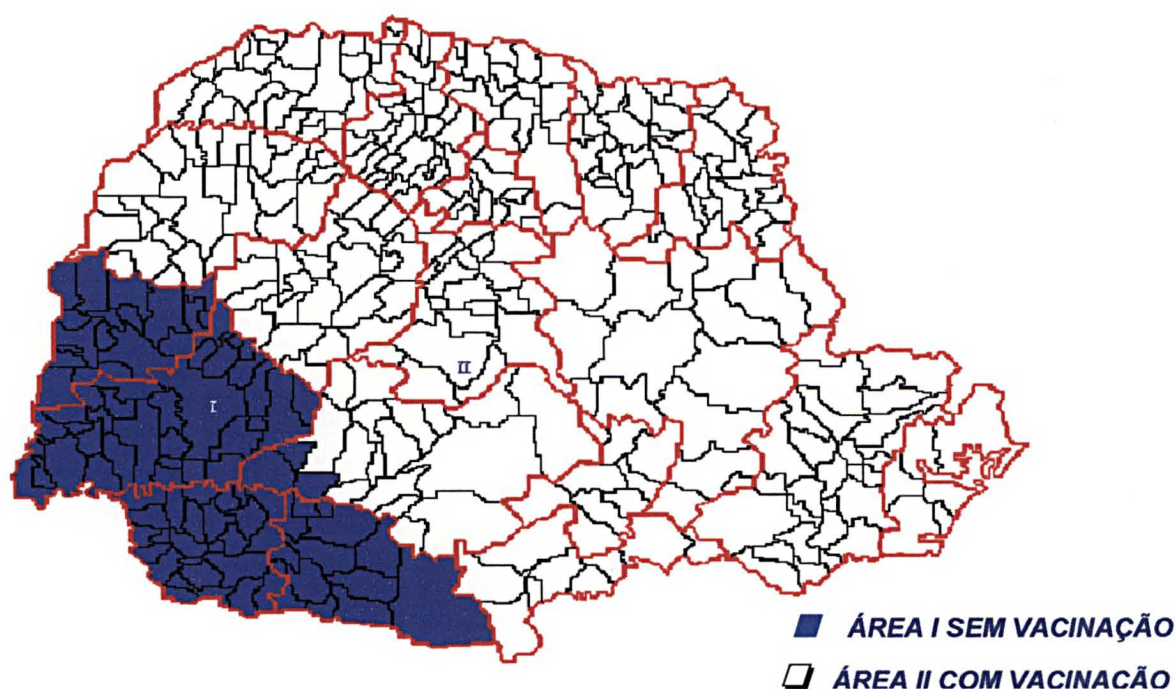


Figura 1. Estado do Paraná, divisão das Áreas I e II para o Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica (Brasil, 1992b)

Os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram considerados como Área I (sem vacinação), o Estado do Paraná foi subdividido em Área I (sem vacinação) e Área II (vacinação obrigatória), sendo que a Área I correspondia às regiões Oeste e Sudoeste (Figura 1) que compreendia 65 municípios (BRASIL, 1992a). Com a suspensão total da vacinação no Estado do Paraná, em 1994, houve necessidade de maior vigilância sanitária, incluindo a remessa ao laboratório de grande número de amostras de órgãos de suínos abatidos em frigoríficos com inspeção e fragmentos de órgãos provenientes de granjas com qualquer suspeita clínica da doença, para isolamento viral, ou seja, para a monitorização de atividade viral nos rebanhos. Três anos após a suspensão da vacinação, quando o número de animais não submetidos à vacinação já se tornara significativo, a monitorização sorológica tornou-se prática de rotina de grande valia no controle e na erradicação da doença (BRASIL, 1992b).

O Estado do Paraná encontra-se em fase final do programa de erradicação da PSC, sendo que a vacinação passou a ser proibida em setembro de 1994, e o último foco registrado até então, foi em junho de 1993. A vigilância sanitária dos rebanhos passou a ser feita através de amostragens sorológicas. No período compreendido entre junho de 1993 e outubro de 1997 não foi detectada atividade viral (PARANÁ, 1993-1997).

No Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti" (CDME / SEAB), em outubro de 1997, foi isolado o vírus da PSC a partir de amostras enviadas do município de São Pedro do Iguaçu, localizado na região de Toledo no sudoeste do Estado, a qual é responsável por 40,11% da produção total de suínos do Estado (PARANÁ, 1997a ; PARANÁ, 1999).

Na propriedade registrada como o primeiro foco da doença, a manifestação clínica foi evidente em animais com idade entre dois e três meses, os quais apresentaram febre, apatia, sonolência, tremores, manchas avermelhadas na pele, conjuntivite, diarreia, vômito, tremores, posição de “cão sentado” e tendência em agrupar-se. No segundo foco da doença, uma propriedade produtora de leitões, os maiores problemas foram encontrados nas matrizes, as quais apresentaram febre alta e abortamento no terço final da gestação, e na creche, com mortalidade de leitões entre 30 e 35 dias de idade apresentando os mesmos sinais clínicos já citados para o primeiro foco (PARANÁ, 1997b).

Uma das medidas profiláticas de emergência adotadas durante o foco foi o sacrifício e a incineração de cerca de 2000 animais e a interdição das propriedades contidas num raio de 3 km, denominada área de proteção, de onde foram colhidas amostras para diagnóstico laboratorial nos dias 0 e 35 após o início do primeiro foco e, a seguir, num raio de 10 km, denominada de zona de vigilância (PARANÁ, 1997c).

Em 15 de maio de 1998, foi oficialmente proibida a vacinação contra PSC em todo o país (BRASIL, 1998). A partir daquela data, a vacina só pode ser usada sob estrito controle oficial, em áreas limitadas em torno de focos onde o diagnóstico tenha sido confirmado em laboratório autorizado (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

A proibição da vacinação nos países que desejam ser considerados livres da PSC, apoia-se no fato de não ser possível diferenciar os anticorpos vacinais daqueles devidos à infecção.

Atualmente, os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso foram declarados livres da doença. Estes estados deverão realizar monitorizações sorológicas periódicas, com vistas à confirmação da ausência da circulação do vírus nas regiões mencionadas (BRASIL, 1998).

1.1. OBJETIVO GERAL

1) Verificação da soroprevalência de anticorpos contra a PSC e de vírus circulante da PSC no rebanho suíno do Estado do Paraná, no período compreendido entre março de 1997 e junho de 2000

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar a precisão das técnicas utilizadas para triagem (ELISA – Enzyme linked Immunosorbent assay) e confirmação (virusneutralização) da presença de anticorpos contra PSC no soro sanguíneo dos suínos.

2) Comparar a precisão entre as técnicas utilizadas para a detecção de antígeno da PSC, das provas de imunofluorescência e imunoperoxidase em cortes histológicos, isolamento viral em cultivos celulares e ELISA de captura de antígeno.

3) Verificação de reações sorológicas cruzadas entre Peste Suína Clássica e Diarréia Bovina Viral, tanto na técnica de ELISA para detecção de anticorpos, como na virusneutralização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DEFINIÇÃO

A Peste Suína Clássica (PSC) é uma enfermidade viral altamente contagiosa que acomete os suínos. A infecção pode ter curso agudo, subagudo, crônico, atípico ou inaparente. A PSC em sua forma aguda é causada por cepa de alta virulência e geralmente resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade podendo chegar a 100%. Por outro lado, infecções com cepas de baixa e moderada virulência determinam o aparecimento das formas clínicas atípicas, crônicas ou subclínicas da doença podendo passar despercebidas (MENGELING & PACKER, 1969; VAN OIRSCHOT, 1980; TERPSTRA, 1991; OIE, 2000a). Todavia, tais cepas de baixa virulência podem causar mortalidade em fetos e leitões (VAN OIRSCHOT, 1992).

Segundo TERPSTRA (1991), o suíno é a espécie na qual a doença é reconhecida naturalmente. Todas as raças e idades são susceptíveis. No entanto, os adultos geralmente tem maiores chances de sobreviver à infecção. Podem também ocorrer

naturalmente surtos de PSC em javalis (*Sus scrofa ferus*). THIEL *et al.* (1996), citam como hospedeiros naturais da PSC os membros da família *Suidae*.

O espectro de hospedeiros das pestiviroses é de considerável importância prática nos animais domésticos. Originalmente essas viroses foram isoladas das espécies nas quais induz a doença, como a PSC em suínos BVD (Diarréia Bovina Viral) em bovinos e BD (Border Disease) em ovinos, mas logo tornou-se claro que com facilidade cruzavam a barreira entre as espécies. Nas condições de campo, as infecções de suínos por pestiviroses de ruminantes, como bovinos, ovinos ou caprinos, são freqüentemente observadas. Normalmente, os suínos tornam-se virêmicos e desenvolvem imunidade sem apresentar os sinais clínicos da doença. Contudo, existem registros de pestiviroses de ruminantes induzindo sinais clínicos em suínos que se assemelham aos das cepas de baixa virulência da PSC (TERPSTRA & WENSVOORT, 1988; VANNIER *et al.*, 1988). Em experimentos recentes tem sido demonstrado que a PSC pode ser transmitida para ovinos, caprinos e também bovinos (CABREY *et al.*, 1976; TERPSTRA & WENSVOORT, 1988; DAHLE *et al.*, 1991; DAHLE *et al.*, 1993; THIEL *et al.*, 1996).

As epidemias de PSC na Europa, nos últimos anos, resultaram em perdas econômicas substanciais. Os países mais severamente afetados foram a Holanda, a Alemanha e a Espanha, onde foram abatidos 10 milhões, 2 milhões e 1 milhão de suínos respectivamente e, ainda com perdas menores a Bélgica e a Itália, as perdas econômicas puderam ser avaliadas em mais de 4 bilhões de dólares (KRETZDORN, 1998; SCNEIDEREIT, 1998).

Sendo assim, grande importância econômica é atribuída à PSC na suinocultura industrial, porque além de diminuir a produtividade do plantel nas suas formas crônicas e

causar alta taxa de mortalidade nas agudas, limita a movimentação e a comercialização de animais e seus subprodutos para regiões e países onde a doença já foi erradicada ou está em processo de erradicação.

2.2. ETIOLOGIA

O vírus da PSC pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (WENGLER, 1991). Os vírus da "Diarréia Viral dos Bovinos" e o vírus da "Border Disease" ou "Doença da Fronteira" dos ovinos também pertencem ao gênero *Pestivirus*. Os *Pestivirus* estão intimamente relacionados entre si tanto estruturalmente, como antigenicamente (OIE, 2000a). Existem reações cruzadas de intensidade variável, sorologicamente detectáveis, entre os três *Pestivirus* reconhecidos (DARBYSHIRE, 1960; PATON *et al.*, 1995; SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

O vírus da PSC mede 40-50 nm de diâmetro e densidade em coluna de CsCl entre 1.15 e 1.17 g/mL, com um nucleocapsídeo de forma hexagonal medindo cerca de 29 nm. É um RNA vírus envelopado que contém pelo menos três polipeptídeos estruturais (VAN OIRSCHOT, 1980). Possui duas glicoproteínas, a E2 (gp51-gp54) com peso molecular de 55.000 daltons e E^{ms} (gp44-gp48) com 46.000 daltons localizadas na superfície e E1 (gp31) com 36.000 daltons e uma proteína não glicosilada localizada no nucleocapsídeo (COLIJN *et al.*, 1997). A glicoproteína E2 do envelope contém os maiores determinantes antigênicos, os quais desempenham importante papel na virusneutralização (WENSVOORT *et al.*, 1990).

A fita simples de RNA do vírus é infectante e possui comprimento de 12 kb. Existe um alto grau de homologia na seqüência de nucleotídeos dos genomas, cerca de 66%, e nos aminoácidos, cerca de 85%, entre as cepas dos vírus da PSC e de BVD, justificando, desta forma, a necessidade de diferenciação entre as duas cepas após o isolamento (MEYERS & THIEL, 1989; MOORMANN *et al.*, 1990).

Através de métodos físicos, a inativação do vírus da PSC depende do meio onde se encontra a amostra. Assim, a infectividade é perdida em fluidos de cultivo celular após 10 minutos à temperatura de 60° C. No entanto, em sangue desfibrinado o vírus não é inativado após 60 minutos a 64° C ou após 30 minutos à temperatura de 68° C (TERPSTRA, 1991). O vírus se mantém estável em uma faixa de pH entre 5 e 10, acima e abaixo destes valores a infectividade é rapidamente perdida. Os solventes lipídicos como o éter, clorofórmio e desoxicolato inativam rapidamente o vírus. O desinfetante de eleição utilizado é o hidróxido de sódio a 2%. Nas baias e em dejetos o vírus perde a infectividade em poucos dias. Em animais mortos, não submetidos à conservação, o vírus permanece viável por poucos dias. Nas carcaças refrigeradas, pode persistir ativo por mais de um mês e, na carne congelada, por mais de quatro anos. É relativamente resistente às influências ambientais externas, especialmente ao frio e à dessecação (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

A confirmação do diagnóstico da PSC deve ser laboratorial, uma vez que existe uma grande variabilidade nos sinais clínicos e em lesões *post-mortem*, que não são patognomônicas. Isto é absolutamente necessário, tendo em vista as sérias conseqüências de um foco de PSC para o comércio de suínos e produtos suínos (OIE, 2000a).

Os *Pestivirus* podem ser propagados em cultivos primários de célula e de linhagem das respectivas espécies hospedeiras. O BVDV é um contaminante comum do soro fetal bovino utilizado como fator de crescimento nos meios para cultivos celulares (POTGIETER, 1992). A contaminação do soro fetal bovino muitas vezes dificulta o diagnóstico, levando a resultados inesperados ou ainda quando utilizado na produção industrial, resultar em produtos impuros; um exemplo prático ocorreu na produção de vacina com vírus vivo para suínos, que foi responsável por veicular o vírus da PSC, fato também ocorrido com BVD (THIEL *et al.*, 1996; VANNIER *et al.*, 1988; WENSVOORT & TERPSTRA, 1988).

A maioria das cepas dos *Pestivirus* crescem em cultivos celulares sem induzir efeito citopático, sendo designados de não citopatogênicos (THIEL *et al.*, 1996).

Embora o vírus da PSC possa replicar-se em células originárias de outras espécies, os cultivos celulares de rim de suínos são mais freqüentemente indicados para o isolamento viral. A replicação viral é restrita ao citoplasma celular. A primeira progênie de vírus é liberada das células nas primeiras cinco a seis horas após a infecção. Sob condições de um ciclo normal de crescimento, há um aumento exponencial do título viral até quinze horas após a infecção, após o qual o vírus continua sua replicação em alto nível por vários dias. Em cultivos celulares o VPSC (vírus da peste suína clássica) dissemina-se através do meio de cultivo, para as células vizinhas por meio das pontes citoplasmáticas e por divisão celular para as células filhas. Em razão da maturação viral ocorrer nas membranas intracitoplasmáticas, torna-se difícil detectar antígenos virais na superfície da membrana das células infectadas (VAN OIRSCHOT, 1992).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

O vírus da PSC é eliminado pelo animal doente ou portador, por todas as secreções e excreções, que se constituem nas principais fontes de infecção. Após 48-72 horas de infecção, o vírus já pode ser isolado das fezes, da urina e da saliva. No sangue, sua concentração máxima é atingida ao redor do 5º ao 8º dias pós infecção (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

Segundo TERPSTRA (1991), o vírus pode ser transmitido, experimentalmente pelas vias oral, intranasal, conjuntival, genital e parenteral. As vias oral e nasal são provavelmente as mais comuns no campo, embora possam também ocorrer infecções via pele lesionada. A transmissão mecânica pelo homem é de grande significância nas áreas com alta densidade de suínos e de granjas de suínos (TERPSTRA, 1987). Os produtores, castradores, inseminadores e veterinários podem transmitir o vírus através de instrumentos contaminados e drogas de uso via parenteral. A prática comum na medicina veterinária de não trocar seringas e agulhas e de não descartar particularmente os frascos usados entre rebanhos diferentes é motivo de preocupação. A transmissão pelo ar foi difícil de estabelecer em condições experimentais (TERPSTRA, 1987). A transmissão por roupas contaminadas, botas, pequenos animais e roedores, é rara, sendo que a quantidade de vírus transmitida desta forma é normalmente abaixo da dose infectante mínima para os suínos (TERPSTRA, 1991).

LAEVENS *et al.* (1998) confirmaram experimentalmente que em leitões o vírus da PSC é altamente contagioso pelo contato direto. Através do ar, o vírus foi transmitido para um grupo sentinela somente após todos os animais da baia infectada estivessem

em fase de viremia. Por outro lado, roupas contaminadas não mostraram significativa contribuição para a disseminação da doença.

Segundo DE SMIT *et al.* (1999a), suínos adultos infectados com o VPSC, podem excretar vírus com o sêmen e podem, subseqüentemente, transmiti-lo para fêmeas e seus fetos via inseminação artificial. Nesse experimento houve isolamento viral a partir do sêmen coletado desde 5 até 11 dias após a inoculação viral.

O vírus pode circular em suínos selvagens, sendo que tais populações infectadas representam um risco em potencial para os suínos domésticos, tanto pela cadeia alimentar como pelo contato direto, como pode ocorrer em áreas onde os suínos são mantidos em criações livres (TERPSTRA, 1991).

Segundo VAN OIRSCHOT (1980), as características do indivíduo, como a idade, constituição genética, condição nutricional e resposta imune podem influenciar de maneira marcante na susceptibilidade do animal, mas esses fatores do hospedeiro alteram somente os quadros clínicos e a susceptibilidade onde estão envolvidas as cepas de moderada virulência. Tais alterações não se manifestam comumente quando se trata de infecções por cepas de baixa ou alta virulência.

DEPNER *et al.* (1997), relacionaram as mudanças de quadro clínico observadas não somente com a cepa viral envolvida mas também com as características genéticas dos suínos, evidenciando portanto, que o genótipo dos animais tem considerável influência na forma de manifestação clínica da doença.

Muitos países, incluindo aqueles da Comunidade Européia, apoiam seus programas de erradicação no diagnóstico rápido e no abate dos rebanhos infectados, suplementados por outras medidas de controle. Ainda com estas medidas a PSC não

tem sido eliminada em muitos países. Isto pode ser explicado pela alta densidade populacional de suínos em determinadas áreas, o movimento de suínos e seus subprodutos por longas distâncias, e a freqüente dificuldade em rastrear o início dos focos da doença. O surgimento de cepas do vírus de PSC de reduzida virulência é, também, um dos fatores mais importantes para explicar a falta de sucesso nos programas de erradicação até o momento (VAN OIRSCHOT, 1980). Tais cepas causam infecções persistentes e inaparentes que são clinicamente difíceis de reconhecer e portanto, podem ser diagnosticadas somente após a transmissão do vírus para outros rebanhos (CORTIER, 1978; TERPSTRA *et al.*, 1984; VAN OIRSCHOT & TERPSTRA, 1989; EDWARDS, 1990).

VAN OIRSCHOT & TERPSTRA (1977a), descreveram a infecção congênita da PSC caracterizada por viremia persistente, excreção contínua do vírus e aparecimento tardio da doença, com a morte ocorrendo entre 2 e 11 meses após o nascimento. Em um segundo trabalho, VAN OIRSCHOT & TERPSTRA (1977b), relataram que nesses animais com infecção congênita, após o desaparecimento dos anticorpos maternos, não foram mais detectados anticorpos contra o Vírus da Peste Suína Clássica (VPSC) e que o seu tempo médio de sobrevivência é de 6 meses. Todavia, os animais mostraram resposta imune normal frente a outros dois antígenos não relacionados. Essas observações sugerem a presença de imunotolerância. A imunidade mediada por células, mostrou-se normal.

Da mesma forma, ocorrem infecções congênitas com BDV (vírus da border disease) ou BVDV em suínos, podendo ser acompanhadas por sinais clínicos e lesões *post-mortem* semelhantes às apresentadas nas formas crônicas da PSC, apresentando

ainda o quadro de imunotolerância (TERPSTRA & WENSVOORT, 1988; VANNIER *et al.* 1988; TERPSTRA & WENSVOORT, 1997).

A imunotolerância é um fenômeno de ocorrência rara, resultante de infecções transplacentárias por amostras de VPSC de baixa patogenicidade, nas fases iniciais da gestação (VAN OIRSCHOT, 1983). Esses animais eventualmente morrem em consequência da doença. O quadro clássico de portador sadio, como observado em infecções por vírus da BVD, onde o animal permanece sadio indefinidamente, não se verifica na PSC (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

2.4. PATOGENIA

Em condições naturais, a rota de entrada do vírus da PSC no hospedeiro é a oronasal (VAN OIRSCHOT & TERPSTRA, 1989). As infecções naturais por cepas de alta virulência são caracterizadas por uma fase linfática, virêmica e visceral (TERPSTRA, 1991). Após a replicação inicial nas células epiteliais das criptas das tonsilas, o vírus invade o tecido linforreticular de onde é drenado para todos os linfonodos regionais, replicando-se e dando início a fase virêmica (DUNNE & LUEDKE, 1959b, RESSANG, 1973). Grandes quantidades de vírus são produzidas nos tecidos alvo secundários, como baço, linfonodos viscerais, medula óssea e trato digestivo. Isto resulta em um alto nível de vírus no sangue e a invasão dos órgãos parenquimatosos, do trato respiratório e do sistema nervoso central. A infecção parece ser mediada via fagocitose pelas células retículo endoteliais e pelo crescimento do vírus através do endotélio vascular. A replicação viral nos leucócitos e nas células do sistema retículo endotelial ocasiona

leucopenia e predispõe o animal à infecções bacterianas secundárias. As cepas de alta virulência atingem todo o organismo dentro de cinco a seis dias (TERPSTRA, 1991).

As infecções por cepas de moderada virulência seguem a mesma via das cepas de alta virulência, porém, o processo é mais lento e a concentração de vírus no sangue e nos órgãos tende a ser mais baixa. As infecções por cepas de baixa virulência são restritas principalmente a fase linfática, sendo a fase virêmica curta (TERPSTRA, 1991).

A infecção de fêmeas prenhes pode resultar em transmissão transplacentária em todas as fases da gestação. O vírus normalmente se espalha via hematogênica e cresce em um ou mais locais através da placenta e subsequentemente passa de feto para feto (VAN OIRSCHOT, 1979a). Os fetos tornam-se virêmicos e a disseminação do vírus nos tecidos parece ser similar àquela que ocorre com infecção pós natal por cepa de alta virulência. As consequências de uma infecção intrauterina dependem de vários fatores como, por exemplo, a fase da gestação e a virulência da cepa envolvida. Os fetos infectados durante os primeiros quarenta e cinco dias de gestação são mais propensos à morte pré-natal ou a desenvolverem infecção persistente e tolerância imunológica, ao contrário do que ocorre com os fetos infectados aos sessenta e cinco dias ou mais tarde. Por outro lado, os fetos infectados com cepas de moderada virulência nos últimos quarenta e cinco dias de gestação apresentam com maior frequência sinais da doença no nascimento ou logo após o nascimento, ou eliminam o vírus nos casos de cepas de baixa virulência (VAN OIRSCHOT, 1979b; VIDOR, 1980).

Nas formas clínicas de evolução mais lenta, deve-se considerar a importante ação patogênica de agentes secundários, nas lesões observadas na necropsia, principalmente a associação da infecção com *Salmonella choleraesuis* (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

2.5. SINAIS CLÍNICOS

Com base nos sinais clínicos é possível distinguir um curso agudo, subagudo ou crônico da PSC.

Nos casos agudos, são observadas hipertermia, anorexia e leucopenia após um período de incubação de dois a quatro dias. Posteriormente, podem aparecer conjuntivite, lesões hemorrágicas na pele e sinais de problemas digestivos e do trato respiratório. Durante os estágios finais da doença, os suínos mostram fraqueza dos membros posteriores, normalmente seguida por paresia. Podem também ocorrer convulsões durante a forma aguda. Em geral, os animais infectados morrem dentro de vinte dias após a infecção (TERPSTRA, 1991, LAEVENS *et al.*, 1999).

Nos casos subagudos, os animais afetados mostram um quadro clínico similar, porém, menos severo do que no agudo, após um período de incubação prolongado. Os animais sucumbem dentro de trinta dias pós infecção (VAN OIRSCHOT, 1980).

O quadro patológico da PSC aguda e subaguda é o de uma doença septicêmica, caracterizada por hemorragia petequial múltipla e equimótica, devido a degeneração do endotélio capilar e a uma falha no mecanismo da coagulação sangüínea. As lesões histopatológicas consistem de necrose linfóide e depleção de linfócitos, acompanhadas de hiperplasia das células reticulares (VAN OIRSCHOT, 1980).

Quando os animais sobrevivem além de trinta dias, a infecção é considerada crônica (MENGELING & PACKER, 1969). Tais infecções são caracterizadas por períodos prolongados e intermitentes de anorexia, febre, viremia e diarreia. Pode ocorrer alopecia seguida de dermatite. As infecções persistentes levam a um severo retardo no

crescimento com conseqüente aparecimento de animais refugo. Os animais com infecção crônica podem permanecer doentes por meses antes de morrer (VAN OIRSCHOT & TERPSTRA, 1977a).

As fêmeas prenhes infectadas por cepas de moderada à baixa virulência podem desenvolver a síndrome da fêmea portadora. Dependendo do estágio da gestação e da virulência da cepa envolvida, as infecções congênitas podem resultar em aborto, mumificação fetal, natimortos, nascimento de leitões fracos e com tremores, morte logo após o nascimento ou leitões aparentemente saudáveis mas persistentemente infectados. Os leitões fracos recém nascidos comumente desenvolvem alopecia, hidropsia e edema subcutâneo ou, menos freqüentemente, má formação visceral e necrose das extremidades. A maioria dos leitões são infectados via intrauterina e morrem logo após o nascimento, mas cepas de baixa virulência podem ocasionar o aparecimento tardio do quadro clínico. Essa forma é caracterizada pelo desenvolvimento normal do leitão por várias semanas ou meses antes do aparecimento dos sinais da doença, tal como anorexia moderada, depressão, conjuntivite, dermatite, diarreia intermitente e distúrbios na locomoção (VAN OIRSCHOT & TERPSTRA, 1977a). A temperatura corporal é normal ou levemente elevada, a contagem de leucócitos é de normal a levemente alterada com uma tendência a desenvolver leucocitose no estágio final da doença.

As cepas de moderada virulência normalmente causam infecções inaparentes resultando em uma doença moderada e transitória (TERPSTRA, 1991).

Em infecções experimentais, por LAEVENS *et al.* (1998, 1999), os primeiros sinais clínicos da doença, após a inoculação de uma cepa de campo do vírus da PSC isolada

na Bélgica, foram apatia, diminuição do consumo de alimento e aumento da temperatura retal.

2.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da PSC é uma combinação entre anamnese, diagnósticos clínico e laboratorial. O diagnóstico precoce a partir dos animais infectados é de grande importância para conter a disseminação da doença.

2.6.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Os focos de PSC aguda típica podem ser diagnosticados a campo com certeza razoável baseados em uma anamnese precisa e minuciosa investigação clínica e patológica. A anamnese do foco de PSC freqüentemente inclui: compra recente de animais, casos de PSC nas adjacências da propriedade, alimentação com lixo ou visita recente de pessoas em contato com suínos. A PSC aguda se alastra rapidamente entre animais de todas as idades e há alta mortalidade uma a duas semanas após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos. À necropsia, lesões significativas para o diagnóstico são hemorragias nos linfonodos, rins e outros órgãos e baço enfartado.

São sugestivas de PSC aguda as observações de febre alta (40,5 a 42° C), afetando tanto animais jovens como adultos, associada à conjuntivite e à presença de descoloração vermelho - azulada nas superfícies cutâneas das orelhas, focinho, abdômen e face interna dos membros, associados a um quadro geral de apatia, anorexia

e agrupamento dos animais enfermos. A identificação de leucopenia acentuada e trombocitopenia grave, com linfocitose relativa, representam importantes informações de apoio ao diagnóstico da PSC (SOBESTIANSKY *et al.*, 1999).

A PSC aguda pode ser confundida patológica e clinicamente com peste suína africana, salmonelose septicêmica, pasteurelose, estreptococose, erisipelas ou infecção com *Haemophilus suis* (VAN OIRSCHOT, 1992). Hemorragias generalizadas não acompanhadas de febre podem sugerir, em animais jovens, uma trombocitopenia ou, em todas as idades, ação do dicumarol ou outros venenos. O quadro clínico da PSC crônica pode ser confundido com problemas nutricionais, enterotoxemia por *Escherichia coli* ou *Clostridium perfringens* e desinteria causada por vibrião por causar diarreia, retardo no crescimento ou desenvolvimento de animais refugio (TERPSTRA, 1991). Em muitos países onde os programas de erradicação recomendam o abate dos rebanhos positivos, qualquer diagnóstico clínico deve ser confirmado em laboratório, em função das graves conseqüências de um foco de PSC (VAN OIRSCHOT, 1992).

2.6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A grande variabilidade nas manifestações clínicas da PSC normalmente impede o diagnóstico baseado somente nos achados clínicos e patológicos. Os métodos laboratoriais são portanto, essenciais para um diagnóstico seguro da PSC.

O diagnóstico laboratorial da PSC é baseado na detecção do antígeno viral nos tecidos do animal sob suspeita, pela técnica de imunofluorescência direta, em cortes histológicos por micrótomo com criostato. Em alguns casos, é necessário o isolamento viral em cultivos celulares. Sob algumas circunstâncias, a sorologia tem valiosa contribuição no controle da doença. Quando o diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos, é necessária a diferenciação entre PSC e BVD (VAN OIRSCHOT, 1980). Como os suínos podem ser, e comumente são infectados com BVDV (vírus da diarreia bovina viral), o diagnóstico sorológico deve basear-se nos testes de vírusneutralização cruzada e, mais recentemente, nos testes de ELISA de captura de antígeno (ERICKSON, 1992).

O meio de cultivo celular para as linhagens PK15 e MDBK, contém obrigatoriamente, soro fetal bovino como um fator de crescimento. A qualidade do soro fetal bovino é fundamental, pois um soro que esteja contaminado com o vírus da BVD ou ainda contenha anticorpos neutralizantes contra o vírus da BVD, vai comprometer totalmente o resultado de um diagnóstico, para tanto muitos estudos tem sido direcionados para a eliminação do uso de soro fetal bovino no meio de crescimento dos cultivos celulares. SAKODA et al. (1998b), estabeleceram uma linhagem celular (CPK-NS) que dispensa o uso de soro fetal bovino no meio para o cultivo celular.

2.6.2.a. Detecção do antígeno viral

O teste de imunofluorescência, a partir de cortes histológicos em micrótomo com criostato, é um método rápido, seguro e pode ser usado para a detecção direta do antígeno viral. As amostras podem ser colhidas de animais mortos ou doentes e enviadas ao laboratório sem adição de conservantes, sob refrigeração, mas não congeladas. Os órgãos de eleição para o diagnóstico laboratorial são as tonsilas, baço, rim, linfonodos submandibulares e mesentéricos e a porção distal do íleo. A tonsila, que é o primeiro tecido a tornar-se positivo para a detecção do antígeno, após a exposição ao VPSC, é o órgão de eleição para detecção do antígeno viral (RESSANG, 1973). A porção distal do íleo é frequentemente positiva para detecção viral nos quadros clínicos mais prolongados da PSC. A ausência de antígeno viral em vários tecidos não exclui a PSC como causa de foco. Quando a suspeita se mantém, mais animais devem ser examinados e deve-se proceder a tentativa de isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK15 - CCL33 (ATCC, 2000), células de rim de suíno normal. O teste de imunofluorescência nos tecidos é sensível, específico, simples, rápido e confiável, razão pela qual tornou-se a técnica de diagnóstico oficial para muitos programas de erradicação da PSC (VAN OIRSCHOT, 1992).

Como o VPSC e BVDV são antigenicamente semelhantes, a imunofluorescência com anticorpos policlonais falha em discriminar entre os antígenos da PSC e BVD. Quando suínos são infectados com BVDV podem resultar em diagnóstico falso positivo para PSC.

Para diferenciar entre VPSC e BVDV pode-se lançar mão do diagnóstico de neutralização cruzada a partir de soro sanguíneo de animais em contato com o animal

suspeito, porém, esse é um diagnóstico laborioso e a obtenção do resultado é demorada. Uma diferenciação rápida pode ser feita com o uso de anticorpos monoclonais, conjugados com peroxidase ou outro imunomarcador, em cortes histológicos ou em cultivos celulares inoculados com material suspeito (WENSVOORT *et al.*, 1989 a; EDWARDS *et al.*, 1991; EDWARDS & PATON, 1995).

Em suínos vacinados contra PSC com a cepa Chinesa (C) atenuada, o antígeno viral pode ser demonstrado nas tonsilas por imunofluorescência direta por até duas semanas após a vacinação. Portanto, nas áreas onde é praticada a vacinação, pode tornar-se necessária a diferenciação entre cepas virais de campo e a cepa vacinal, que pode ser realizada com anticorpos monoclonais conjugados com imunoperoxidase (WENSVOORT *et al.*, 1986). As cepas virais lapinizadas também podem ser diferenciadas das cepas de campo por sua habilidade em induzir febre e a produção de anticorpos contra VPSC, após inoculação intravenosa em coelhos (MIHAITA *et al.*, 1969; TERPSTRA, 1978a, VIDOR, 1980).

O isolamento e a identificação dos *Pestivirus* em cultivos celulares é um método mais sensível, porém, mais lento para o diagnóstico e a diferenciação, do que a detecção direta de antígenos virais através dos testes de imunofluorescência e imunoperoxidase em cortes histológicos (BLOEMRAAD, 1997). Segundo DUNNE *et al.* (1959a), foi possível isolar o VPSC a partir de amostras de sangue de suínos, 24 horas após inoculação por via oral.

Um método de apoio mais recentemente utilizado com sucesso é o ELISA de captura de antígeno, que mostra, como vantagens, alta sensibilidade, facilidade e rapidez no diagnóstico, a partir de fragmentos de órgãos (ERICKSON, 1992). Como a técnica de

ELISA baseia-se na captura de antígeno, a viabilidade do vírus não prejudica a obtenção de resultados positivos a partir de materiais sem as condições ótimas para o isolamento viral em cultivo celular. O ELISA de captura de antígeno foi suficientemente sensível para detectar o VPSC a partir de amostras de órgãos linfóides em autólise (LIPOWSKI *et al.*, 1998).

2.6.2.b. Detecção de anticorpos

A detecção de anticorpos específicos é particularmente usada em rebanhos suspeitos de infecção onde a detecção de antígeno tenha falhado e em fases finais de programas de erradicação, para detectar rebanhos com infecção subclínica. O diagnóstico sorológico é de substancial importância quando o país deseja tornar-se reconhecido internacionalmente como livre da PSC (VAN OIRSCHOT, 1992).

A detecção de anticorpos contra VPSC pode ser realizada através das técnicas de imunofluorescência indireta (RESSANG & DEN BOER, 1969), imunoperoxidase indireta (SAUNDERS, 1977), fixação de complemento (ESKILDSEN & OVERBY, 1976), imunodifusão dupla em ágar gel (PIRTLE, 1965) ou imunoeletro osmoforese (TERPSTRA, 1978b). Entretanto, nenhum desses testes tem especificidade para diferenciar entre anticorpos contra VPSC (vírus da peste suína clássica) e BVDV (vírus da diarreia bovina viral), razão pela qual os resultados positivos devem ser confirmados pelo teste de neutralização viral.

Duas técnicas de micro-neutralização são utilizadas nos programas de controle e erradicação da PSC, uma delas sendo a virusneutralização com revelação por

imunofluorescência - NIFT (LIESS *et al.*, 1976) e a outra a virusneutralização com revelação por imunoperoxidase (HOLM JENSEN, 1981). Em ambos os métodos são utilizados imunomarcadores pela característica não citopatogênica da cepa (HOLM JENSEN, 1981; TERPSTRA *et al.*, 1984; PEARSON, 1992). A virusneutralização pode ser realizada com cepas de VPSC citopatogênicas (COGGINS & BAKER, 1964; SAKODA *et al.*, 1998a), mas não é comumente utilizada. No entanto, anticorpos contra BVDV são freqüentemente observados em suínos e podem induzir neutralização em baixos títulos contra VPSC (LIESS *et al.*, 1976). Assim deve-se proceder uma prova de virusneutralização cruzada entre BVDV e VPSC (WENSVOORT *et al.*, 1989b), na realidade, uma prova extremamente trabalhosa da qual se obtém resultado somente após 4-5 dias, não sendo pois apropriada para triagem sorológica em grande escala.

Outro método válido para detecção de anticorpos e recomendado quando um grande número de amostras está envolvido, é a técnica de ELISA com anticorpos monoclonais (WENSVOORT *et al.*, 1988; MOENNIG *et al.*, 1990; MÜLLER *et al.*, 1996; COLIJN *et al.*, 1997). Na escolha de um ELISA para uso rotineiro é necessário analisar a situação na qual a região a ser trabalhada se encontra (ex: vacinação, prevalência da doença), pois existem diferenças substanciais de sensibilidade, especificidade entre os vários "kits" empregados para esse tipo de metodologia.

2.6.3. CRITÉRIOS DE VALIDAÇÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

As variáveis que afetam a performance de uma prova de diagnóstico e que devem ser consideradas para a sua validação segundo KRAMPS & VAN ROOIJ (1998); SCHRIJIVER & KRAMPS (1998) e OIE (2000b) são:

a. Fatores que afetam a concentração e a composição da amostra (soro) que podem ser relacionados ao hospedeiro como idade, sexo, raça, estado nutricional, prenhez, resposta imune, imunidade ativa ou passiva ou não relacionados ao hospedeiro como a contaminação ou deterioração da amostra.

b. Fatores que interferem na precisão analítica da prova de diagnóstico, como erros técnicos ou de instrumentação, escolha de reagentes e calibragem, precisão dos controles, reação devido aos recipientes utilizados, qualidade da água, pH e ionicidade dos tampões e diluentes, temperaturas e tempo de incubação, e reações cruzadas.

c. Fatores que influenciam na capacidade de precisão dos resultados que são a especificidade, a sensibilidade do teste e a prevalência da doença na população analisada.

A sensibilidade de um diagnóstico reside na proporção de animais sabidamente infectados que resultarão positivos para determinada prova, e os animais infectados que resultarem negativos, serão considerados falsos negativos.

A especificidade consiste na proporção de animais sabidamente não infectados que vão resultar negativos, enquanto que animais não infectados que resultarem positivos serão considerados falsos positivos.

Embora a sensibilidade e a especificidade sejam importantes características de um teste, o principal parâmetro é o valor preditivo do diagnóstico.

O valor preditivo é a probabilidade com a qual resultados positivos ou negativos no teste predizem ou traduzem a situação real da infecção nos animais, como ausência ou presença da doença.

O grau de concordância entre as provas é medido pelos valores de verdadeiros positivos e negativos divididos pelo número total de amostras testadas (Tabela 1).

O valor preditivo do resultado de um teste de diagnóstico depende da segurança (Tabela 1) que pode ser definida como a somatória da sensibilidade e da especificidade, mas acima de tudo, da prevalência da doença na população alvo .

A relação entre a especificidade e a sensibilidade é inversamente proporcional. Um teste ideal seria o que pudesse apresentar 100% de sensibilidade e de especificidade, o que não ocorre na prática, pois um aumento da sensibilidade resulta em um decréscimo da especificidade, e vice-versa.

Tabela 1. Segurança do teste (sensibilidade e especificidade) e valor preditivo de um diagnóstico (OIE, 2000b).

		Condição do animal		
		Infectado	Não infectado	
Resultado do teste	Positivo	A (VP)	C (FP)	A+B
	Negativo	B (FN)	D (VN)	B+D
		A+B	C+D	A+B+C+D

Sensibilidade = $A / (A+B)$

Especificidade = $D / (C+D)$

Valor preditivo dos positivos = $A / (A+C)$

Valor preditivo dos negativos = $D / (B+D)$

Concordância = $A+D / A+B+C+D$

VP= Positivos verdadeiros

FP= Falsos positivos

VN= Negativos verdadeiros

FN= Falsos negativos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS

3.1.1. AMOSTRAS DE FRAGMENTOS DE ÓRGÃOS

O total de amostras de órgãos de suínos testadas no Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” entre novembro de 1997 e junho de 2000 foi de 631, recebidas de abatedouros ou frigoríficos com fiscalização municipal, estadual e federal, que além do diagnóstico para PSC, foram também submetidas às provas diferenciais para as doenças bacterianas e diarreia bovina viral. Nesse estudo estão incluídos apenas sete amostras recebidas das propriedades envolvidas no foco de PSC, em 1997, já que foi o único episódio onde houve detecção viral durante o período estudado.

Para as provas de detecção direta de antígeno viral em cortes histológicos, isolamento viral em cultivos celulares e ELISA de captura de antígeno, foram enviados sob refrigeração fragmentos de órgãos como tonsilas, baço, rins, porção distal do íleo, linfonodos e fígado.

3.1.2. AMOSTRAS DE SORO SANGÜÍNEO

Foram testadas 36.507 amostras de soro sangüíneo suíno, para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC. Todas as amostras são de suínos oriundos de propriedades do Estado do Paraná, podendo ser subdivididas em três etapas:

- a) uma granja de reprodução de suínos que realizou vacinação clandestina contra PSC, de onde foram examinadas 460 matrizes com testes comparativos para detecção de anticorpos contra PSC entre as técnicas de ELISA e virusneutralização, e ainda, testes de virusneutralização para detecção de reação cruzada entre PSC e BVD.
- b) propriedades analisadas classificadas como granjas de suínos com mínimo de doenças – GSMD (controladas para brucelose, leptospirose e doença de Aujeszky e livres de PSC), granjas de pequeno e médio porte e ainda pequenas propriedades com poucos animais, chamadas de “ fundo de quintal” ou suinocultura de subsistência em um total de 36.095 amostras de soro.
- c) amostras de soro sangüíneo de suínos colhidas de sete animais durante o foco de PSC em 1997, em São Pedro do Iguazu, Paraná (Figura 2).

Todas as amostras foram colhidas pelos Médicos Veterinários da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná ou por responsáveis técnicos das granjas, no período compreendido entre março de 1997 e junho de 2000.

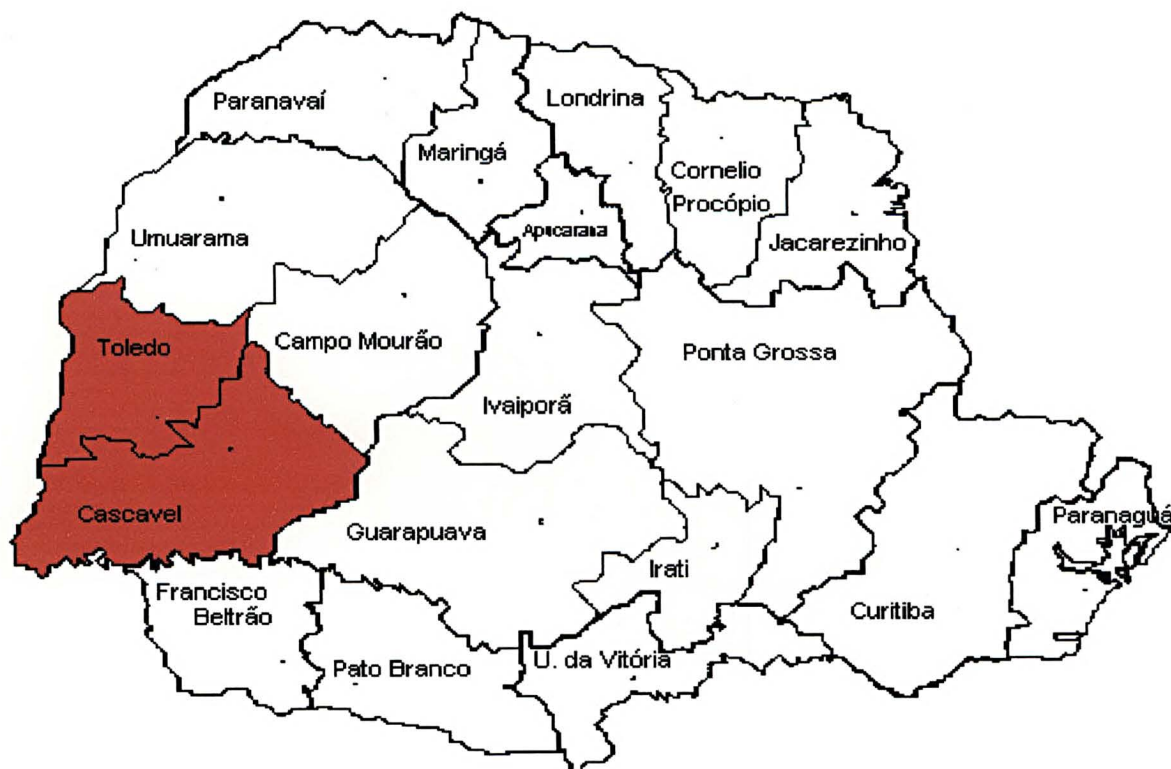


Figura 2. Regiões do Estado do Paraná onde foram realizadas as colheitas de material para a vigilância epidemiológica do foco de Peste Suína Clássica em 1997.

O sangue foi colhido por punção venosa, sem anticoagulante e transferido para tubos apropriados. Após a coagulação sangüínea as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min. e os soros assim obtidos, no mínimo 1 mL, foram enviados sob refrigeração ou congelados para o Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”, acompanhados de uma ficha epidemiológica incluindo dados da propriedade e do rebanho. No laboratório, as amostras foram identificadas com um número de protocolo e armazenadas em congelador à temperatura de -20°C até o seu processamento.

Primeiramente, as amostras foram submetidas a uma prova de triagem pela técnica de ELISA, de onde foram selecionadas as positivas e as suspeitas, que foram

confirmadas por titulação de anticorpos neutralizantes pela técnica de NPLA para PSC e BVD.

3.2. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA PESTE SUÍNA CLÁSSICA

Os soros foram analisados com “kit” de ELISA comercial Ceditest – CSFV (COLIJN *et al.*, 1997) produzido e padronizado pelo “Institute of Animal Science and Health” (ID-DLO – Holanda) para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC, registrado no Ministério da Agricultura sob o número 6.293/98.

Foi escolhida a técnica de ELISA por apresentar as características necessárias para sorologia em grande escala, como, a agilidade no processamento das amostras.

O Ceditest – CSFV foi selecionado por ser de execução rápida e simples, e por apresentar alta especificidade e sensibilidade, distinguindo anticorpos contra o VPSC dos *Pestivirus* dos ruminantes, BDV e BVDV, diminuindo assim o número de amostras a serem retestadas por NPLA .

O Ceditest – CSFV é um ELISA de competição. Os reagentes-chave usados nesse “kit” são dois anticorpos monoclonais direcionados contra a proteína E2 (GP-55) do envelope do vírus da PSC. Os dois anticorpos monoclonais medem a ligação dos anticorpos contra o VPSC do soro em teste, direcionados contra a proteína E2 do vírus da PSC. Cada um dos anticorpos monoclonais reconhece um diferente epítipo da proteína E2 do vírus da PSC. Um anticorpo monoclonal (anticorpo de captura do antígeno) é adsorvido em placa de poliestireno, cobrindo todos os 96 poços da placa. O

segundo anticorpo monoclonal é ligado à enzima peroxidase (“horse-radish peroxidase” – HRPO) e usado como um conjugado. O antígeno usado no “kit” é expresso em linhagem de células de inseto SF21 (*Spodoptera frugiperda*) infectadas com baculovírus contendo o gene da glicoproteína E2 da PSC inserido em seu genoma (HULST & MOORMANN, 1996).

Em uma mesma etapa, foram transferidos para a placa 50 μ L do soro a testar (sem diluir), 50 μ L de conjugado (diluição 1:30 em PBS / Tween 80 0,05%) e 50 μ L do antígeno recombinante do “kit” (diluição 1:30 em PBS / Tween 80 0,05%), nessa ordem, e incubados à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ$ C) por 90 minutos. As placas foram então lavadas três vezes com PBS + Tween 80, quando então foram transferidos para a placa 100 μ L da solução do substrato cromogênico (Tetrametilbenzidina – TMB) e incubadas por mais 15 minutos, tendo sido interrompida a reação pela adição de 100 μ L de uma solução 0,5N de ácido sulfúrico. A leitura foi feita em espectrofotômetro modelo 340 ATC da SLT Labinstruments Ges.m.b.H. - Austria, leitora de placas de ELISA, com filtro de comprimento de onda de 450nm, até 10 minutos depois de interrompida a reação.

Se ambos os anticorpos monoclonais estiverem ligados aos epítomos específicos do antígeno, haverá desenvolvimento de cor, indicando a ausência de anticorpos específicos contra PSC no soro em teste. Ao passo que, se os epítomos do antígeno, presente no “kit”, estiverem bloqueados por anticorpos específicos, presentes no soro, a testar, os anticorpos monoclonais estariam impedidos de se ligar ao antígeno, não havendo desenvolvimento da cor.

Há quatro soros de referência na prova. O soro número 1, um forte positivo, funciona como branco e o seu valor de leitura (absorbância) deve ser subtraído de todos os demais valores encontrados na placa. O valor máximo de absorbância é determinado pelo soro de referência número 4 (soro negativo – soro proveniente de animais livres de agentes patogênicos- SPF). A percentagem de inibição é calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - [100 \times (DO_{450nm} / DO_{max})]$$

DO_{450nm} = absorbância da amostra medida com filtro de comprimento de onda de 450 nm

DO_{max} = absorbância medida do soro de referência número 4 (negativo)

O soro referência 1 dá a percentagem de inibição de 100% e o soro referência 4, a percentagem de inibição 0%. O soro de referência 1 deve ter uma absorbância menor que 0,250 e o soro referência 4 , maior que 1,000. Os soros de referência 2 e 3 são usados para validar o teste e devem ter sempre percentual de inibição maior do que 50% e menor do que 50%, respectivamente. Soros testados com inibições maiores do que 50% serão considerados positivos; os soros com valores de inibição entre 31 e 50% serão considerados suspeitos e os soros que apresentarem valores abaixo de 30% são negativos.

3.3. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO – NPLA (Neutralizing Peroxidase-Linked Assay)

O teste de NPLA (TERPSTRA *et al.*, 1984) segue as normas padronizadas pelo “Office International des Epizooties” (OIE, 2000a). Todas as amostras de soro passam por uma triagem na prova de ELISA, de onde são selecionadas as suspeitas e positivas, que foram submetidas à confirmação pela técnica de NPLA, paralelamente para PSC e

BVD, para eliminar a possibilidade de falsos positivos por reação cruzada (TERPSTRA & WENSVOORT, 1988; DEKKER *et al.*, 1995). Para a técnica de NPLA é necessário diluir os soros desde 1:5 até 1:80 em Minimum Essential Medium - MEM (EAGLE, 1955).

Todo o material utilizado para a realização deste teste deve obrigatoriamente ser estéril e todas as etapas da técnica desenvolvidas em câmara asséptica (Fluxo Laminar Linear Vertical, Tipo II, Trox).

A prova de virusneutralização foi processada em microplacas de poliestireno com 96 poços. Os soros a serem testados são primeiramente inativados por 30 minutos à temperatura de 56° C, para inativar o complemento e possíveis inibidores não específicos (KONEMAN *et al.*, 1992). Para propósitos de trânsito internacional, a diluição dos soros deve iniciar de 1:5 (diluição final 1:10). Para esquemas de vigilância dentro do país, uma prova de triagem partindo de uma diluição de 1:25 é suficiente (CEE, 1991). No presente trabalho foi usada como prova de triagem a técnica de ELISA, portanto, a NPLA partiu de amostras de soros com diluições baixas.

3.3.1. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO PARA PESTE SUÍNA CLÁSSICA (NPLA)

A prova de NPLA utiliza cultivo celular como substrato para a replicação viral. No caso da PSC, foram utilizados cultivos celulares da linhagem PK15 (CCL-33), células epiteliais de rim normal de suíno adulto (ATCC, 2000) susceptíveis ao vírus da PSC. A cepa viral utilizada foi a Alfort 19 (AYNAUD, 1968), tendo sido utilizado o método de concentração viral constante e variação nas diluições do soro sangüíneo a testar (BITSCH, 1978).

3.3.1.a. Cultivo celular

A linhagem de células PK15 foi cultivada em meio de crescimento Eagle (Minimum Essential Medium – MEM Sigma), enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB-Nutricel), 10% de caldo triptose fosfato (Acumedia Manufacturers), L-glutamina 600mg / litro (Merck) tendo como antibiótico a enrofloxacin 5% 0,200µL / mL, o que resulta em uma concentração de 10µg / mL (Baytril injetável 5% – Bayer) e como antifúngico a anfotericina B (Fungizon – Squibb 1,25µg / mL). O meio de cultivo celular pronto foi sempre testado em meio de enriquecimento para crescimento bacteriano caldo cérebro–coração (BHI – Brain Heart Infusion - DIFCO) por 72 horas, à temperatura de 37° C, para detectar eventual contaminação bacteriana.

As células foram cultivadas em incubadora úmida à temperatura de 37° C, com atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas próprias para cultivo celular, de vidro ou descartáveis de poliestireno, podendo estas serem reutilizadas após um processo de lavagem e esterilização (ROWE & ROMERO, 1987).

O banco de células foi armazenado em botijões de nitrogênio líquido (Cryogenic Container, capacidade 50L), onde as células foram congeladas e mantidas até o seu uso. Foi utilizado um meio próprio para congelamento das células, com 10% de dimetilsulfoxido (DMSO - MERCK) como crioprotetor, 40% de SFB e 50% de suspensão celular em MEM. As células foram resfriadas gradativamente nas primeiras 24 horas até -80° C quando foram então colocadas em nitrogênio líquido (-196° C).

O descongelamento das células foi feito rapidamente retirando as ampolas do nitrogênio líquido e colocando-as em banho-maria à temperatura de 37° C. As células foram ressuspensas em tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de crescimento MEM e, então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, para a retirada do meio de congelamento. O sedimento foi ressuspensado com MEM e colocado em garrafas estéreis para cultivo celular, onde ficaram por 48 horas até a confluência da monocamada.

A passagem das células foi realizada utilizando todos os materiais e reagentes estéreis. Procedeu-se primeiro a uma lavagem da monocamada com PBS (pH 7,2) para retirada total das proteínas do SFB contido no meio de cultivo. Em seguida, foi adicionada uma solução de tripsina versene (DIFCO) a 0,25%, pH 7,2 para individualização e então ressuspensão das células com MEM acrescido de 10% de SFB, este último com o objetivo de inibir a ação da tripsina pela presença das α 2-macroglobulinas e ainda como fator de crescimento para as células. As passagens foram realizadas na proporção de 1:2 até 1:4 com substituição de meio no mínimo a cada 48 horas.

3.3.1.b. Amostra viral padrão do laboratório

A cepa viral de PSC utilizada foi a Alfort 19 (AYNAUD, 1968) produzida através da inoculação em cultivo celular da linhagem PK15 ainda em suspensão, mantida em incubadora úmida com atmosfera de CO₂ por 96 horas, a 37° C, para crescimento e multiplicação das células e conseqüente replicação viral, quando então foi congelada a -

-80° C e descongelada lentamente a 8° C para o rompimento das células e conseqüente liberação do vírus. Após o descongelamento a suspensão foi centrifugada a 4° C, por 30 minutos a 5.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5403). O sobrenadante foi colhido, obtendo-se assim a suspensão viral. A suspensão viral foi dividida em alíquotas de 0.8 mL e armazenada à temperatura de -80° C até -196° C em tubos próprios para congelamento, onde manteve título estável.

Para calcular o número de partículas infectantes na suspensão viral foi aplicado o método de diluição final 50%, onde foi determinada, através de imunomarcadores, a TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose), ou seja, a dose capaz de infectar 50% dos cultivos celulares (CEE, 1991; FAO/RLAC, 1992). Foi usado, para o cálculo do título viral, o método de SPEARMAN-KÄRBER *apud* HARRIS (1964). Esse método ajusta a última diluição com presença de vírus para 50%. A partir deste valor foi estabelecida a diluição de trabalho (DT) utilizada neste experimento. A diluição de trabalho deve conter 100 doses infectantes (TCID₅₀) sendo que a prova ainda pode ser validada com valores entre 30 e 300 TCID₅₀.

A titulação viral foi conduzida em cultivo celular de PK15, partindo-se da diluição logarítmica, base 10, de 1:10 (10^{-1}) até 1:100.000.000 (10^{-8}) em MEM adicionado de antibióticos e 2% de SFB. Para cada diluição foram usados 8 poços de uma placa, repetindo-se esse processo em três placas diferentes. Foram adicionados 50µL das diluições para cada poço e 100µL de suspensão de células contendo entre 150.000 e 300.000 células por mililitro. As placas foram posteriormente incubadas por 48 horas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ circulante.

Houve necessidade do uso de imunomarcadores para a revelação da prova pela característica não citopatogênica do vírus da PSC. Portanto, a leitura da titulação viral foi através da fixação da monocamada de células pelo calor em estufa seca à temperatura de 37° C por, no mínimo, 4 horas. Na revelação da prova foi utilizada imunoglobulina G (IgG) de suíno antivírus de PSC (LANARA – MG), 50µL por poço na diluição de 1:300 em solução salina 0,5M, contendo 0,05% de Tween 80 (polyoxyethylenesorbitan-monooleato – SIGMA P8074). As placas foram incubadas por 30 minutos à temperatura de 37° C e posteriormente lavadas 3 vezes com solução de NaCl 0,15M contendo 0,05% de Tween 80. Foram então adicionados 50µl por poço de IgG de coelho anti-suíno conjugada com peroxidase (Anti-Pig IgG HRPO – horse-radish peroxidase – WILSON & NAKANE, 1978), na diluição de 1:1000 em solução de NaCl 0,5M contendo 0,05% de Tween 80. Procedeu-se a uma segunda incubação de 30 minutos à temperatura de 37° C. Após essa incubação as placas foram novamente lavadas como citado acima. A revelação da prova foi levada a efeito com a adição de 50µL do substrato cromogênico por poço. O substrato cromogênico consiste de 4mg de 3-amino-9-etil-carbazol (SIGMA –A5754), 1mL de N,N-dimetil-formamida (SIGMA –D 4254) e 19mL de solução de acetato de sódio 0,05M (REAGEN), pH 5,0. Para cada 20mL dessa solução foram adicionados 10µL de peróxido de hidrogênio 30% P.A. (REAGEN) à temperatura ambiente. Quinze minutos após a adição do substrato cromogênico, as placas foram lidas ao microscópio óptico invertido (Olympus-IM), pela coloração carmim revelada no citoplasma das células infectadas pelo vírus.

3.3.1.c. Neutralização viral

Na prova de virusneutralização foram utilizados 50 μ L de suspensão viral por poço contendo 100 TCID₅₀ (DT), portanto, duas diluições a menos daquela onde se determinou 1TCID₅₀ (diluição final 50%), conforme descrito anteriormente na titulação viral.

Os soros a testar foram selecionados e pré diluídos em MEM nas proporções de 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80. Foram transferidos 50 μ L de cada diluição dos soros, em duplicata, e 50 μ L da suspensão de diluição de trabalho do vírus, ou seja 100 TCID₅₀ para cada poço. A mistura soro-vírus foi levada à incubadora úmida, com 5% de CO₂, à temperatura de 37° C, por 1 hora, para que, quando na presença de anticorpos de um soro positivo, o vírus fosse neutralizado.

Após a incubação, foram adicionados à cada poço da placa 100 μ L de suspensão contendo entre 150.000 e 300.000 células por mililitro. A contagem do número de células foi realizada em câmara de Fuchs-Rosenthal, com adição de corante Azul de Tripán.

Após 48 horas de incubação, as placas foram fixadas e reveladas como descrito anteriormente na titulação viral. A revelação de cor carmim no citoplasma das células indica um soro negativo, ou seja, sem anticorpos neutralizantes para o vírus da PSC. Os poços das placas nos quais não houve desenvolvimento da coloração no citoplasma celular, foram considerados positivos, pois naquela diluição houve reação antígeno-anticorpo, neutralizando as partículas virais presentes (100TCID₅₀).

3.3.2. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO PARA DIARRÉIA BOVINA VIRAL (NPLA)

A prova de NPLA para BVD utiliza como substrato o cultivo celular da linhagem MDBK (CCL-22), células epiteliais de rim normal de bovino adulto (ATCC, 2000) que são susceptíveis ao vírus da BVD. A cepa viral utilizada foi Van Ee, vírus Varken (WENSVOORT *et al.*, 1988; TERPSTRA & WENSVOORT, 1988; WENSVOORT *et al.*, 1989b; TERPSTRA & WENSVOORT, 1997)

Na NPLA para BVD o soro fetal bovino, utilizado como fator de crescimento no meio no cultivo celular, deve ser livre de anticorpos contra BVDV, bem como as células da linhagem MDBK obrigatoriamente livres do BVDV. A linhagem celular MDBK foi testada segundo CASTRO *et al.* (1997).

Com exceção da cepa viral e da linhagem celular utilizadas, todos os reagentes, as técnicas de cultivo celular, a produção e a titulação viral, a virusneutralização e a revelação da prova seguiram os mesmos padrões das utilizadas para PSC.

3.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Na detecção de antígeno viral em cortes histológicos por imunofluorescência indireta (IFI), os fragmentos de órgãos foram processados em micrótomo com criostato (Kryostat -1720 Digital WILD LEITZ - Áustria) na espessura de 8 μm . Os cortes histológicos preparados foram fixados em acetona P.A. por 20 minutos na temperatura de -20°C e então cobertos com anticorpo monoclonal anti-PSC produzido em camundongo

(CVL-Weibridge) e incubadas a 37° C por 30 minutos em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos em PBS pH 8,5 e a seguir com água destilada. Em uma segunda etapa, as lâminas foram cobertas com anticorpo anti-camundongo (SIGMA-A0347) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (THE, 1970a, 1970b) e incubadas novamente a 37° C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas como descrito anteriormente e montadas com glicerina tamponada (pH 8,5), e cobertas com lamínulas para exame ao microscópio com luz ultravioleta (Olympus-CBA) . Essa técnica foi também processada para o diagnóstico diferencial, sendo que neste caso foi utilizado o anticorpo monoclonal direcionado contra o vírus de BVD (CVL-Weibridge).

3.5. IMUNOPEROXIDASE INDIRETA (IPX)

Os cortes foram processados em micrótomo com criostato e fixados da mesma forma descrita para NPLA, alterando apenas os reagentes para a revelação da prova, que foram anticorpo anti-vírus de PSC produzido em suínos (soro hiperimune), pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Vacinas do Ministério da Agricultura, Castro, Paraná, e na segunda etapa, um anticorpo anti-IgG de suíno conjugado com peroxidase (SIGMA-A5670), baseada na técnica de SAUNDERS (1977).

O procedimento para leitura seguiu o mesmo critério daquele utilizado na técnica de NPLA, interpretando a coloração do citoplasma celular pelo carmim, como presença do vírus.

3.6. ISOLAMENTO VIRAL

As células das linhagens PK 15 - CCL 33 (ATCC, 2000) célula epitelial de rim normal de suíno adulto para PSC e MDBK- CCL 22 (ATCC, 2000) célula epitelial de rim normal de bovino adulto para BVD serviram como substrato para o isolamento viral. O meio de crescimento utilizado foi EAGLE - Sigma (EAGLE, 1955) acrescido de penicilina (200UI/mL), estreptomicina (0,2mg/mL), anfotericina B (1,25µg/mL), L-glutamina (0,3mg/mL) e 10% de soro fetal bovino livre de anticorpos contra BVDV (Nutricel-Campinas).

Os fragmentos de órgãos foram macerados separadamente em gral, suspensos a 20% em solução de tampão fosfato com penicilina (200UI/mL), estreptomicina (0,2mg/mL) e anfotericina B (1,25µg/mL), deixados por 1 hora à temperatura ambiente, quando foram então centrifugados sob refrigeração a 6000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi usado como inóculo nas diluições de 1:10 e 1:100 em meio de crescimento EAGLE e inoculados em microplacas de poliestireno (50µL/poço) entre oito e dezesseis repetições para cada diluição, no mínimo.

Foram adicionados 100µL de suspensão celular em média com 300.000 células por mililitro a cada poço, em placas separadas sendo MDBK para BVD e PK15 para PSC. As placas foram incubadas em estufa úmida a 37° C, com 5% de CO₂ por 24, 48 e 72 horas. O mesmo procedimento foi feito em tubos de Leighton . Após a incubação, as placas foram fixadas pelo calor, no mínimo por 4 horas em estufa seca a 37° C, e reveladas pela técnica de IPX como já descrito, uma vez que esses vírus não produzem

efeito citopático. As lamínulas foram retiradas e fixadas com acetona P.A. por 10 minutos a -20° C e reveladas por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais para BVD e PSC.

3.7. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO DE PESTE SUÍNA CLÁSSICA

Utilizou-se um “kit” comercial de ELISA para captura de antígeno de PSC, (Ceditest – CSFV-Ag - ID-DLO - Holanda), no qual as placas são adsorvidas de soro hiperimune anti-PSC vírus. Foram adicionadas às placas as suspensões a 20% dos diferentes fragmentos de órgãos a testar e incubadas à temperatura ambiente por 3 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas e adicionadas de um conjugado contendo diferentes anticorpos monoclonais e incubadas por mais 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, adicionando-se a seguir o substrato cromogênico (TMB) e, então, incubadas por mais 15 minutos até o desenvolvimento da cor, quando a reação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido sulfúrico 0,5N. A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro modelo 340 ATC da SLT Labinstruments Ges.m.b.H. - Austria, leitora de placas de ELISA com filtro de comprimento de onda de 450nm.

4. RESULTADOS

4.1. DETECÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL

Fragmentos de órgãos de sete animais provenientes do foco de PSC em 1997, em São Pedro do Iguaçu, foram submetidas às técnicas de detecção de antígeno e de anticorpos (Tabela 2).

Seis dos sete animais estudados pelas técnicas de IFI e IPX em cortes histológicos (Figuras 3 e 4) e isolamento viral em cultivo celular (Figura 5) apresentaram resultados positivos em fragmentos de órgãos (tonsilas e baço). O animal que apresentou resultado negativo, ou seja, sem detecção de antígeno, foi positivo para presença de anticorpos no soro sanguíneo, pelas técnicas de ELISA e virusneutralização com título de 1:80. Nos outros seis animais que apresentaram resultado positivo para detecção de antígeno, não foi detectada a presença de anticorpos neutralizantes. Foram coincidentes os resultados encontrados nas técnicas de IFI, IPX e isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK15 (Tabela 2).

Todas as provas de diferenciação para BVD, como a detecção de antígeno viral em cortes histológicos utilizando anticorpos monoclonais, isolamento viral em cultivo celular da linhagem MDBK e a virusneutralização, foram negativas.

Tabela 2. Detecção de antígeno viral e de anticorpos em amostras de sete animais, oriundas do foco de Peste Suína Clássica em outubro de 1997, em São Pedro do Iguaçu, Paraná, Brasil.

Animais	Detecção de antígeno (1)		Detecção de anticorpos (2)	
	IPX e IFI	Isolamento viral	ELISA	Neutralização
Nº 1	+	+	-	-
Nº 3	+	+	-	-
Nº 4	+	+	-	-
Nº 5	+	+	-	-
Nº 6	+	+	-	-
Nº 7	-	-	+	+
Nº 8	+	+	-	-

+ Positivo - Negativo

(1) Fragmentos de tonsilas ou baço

(2) Título de anticorpos para NPLA = 1:80

IPX – imunoperoxidase

IFI – imunofluorescência indireta

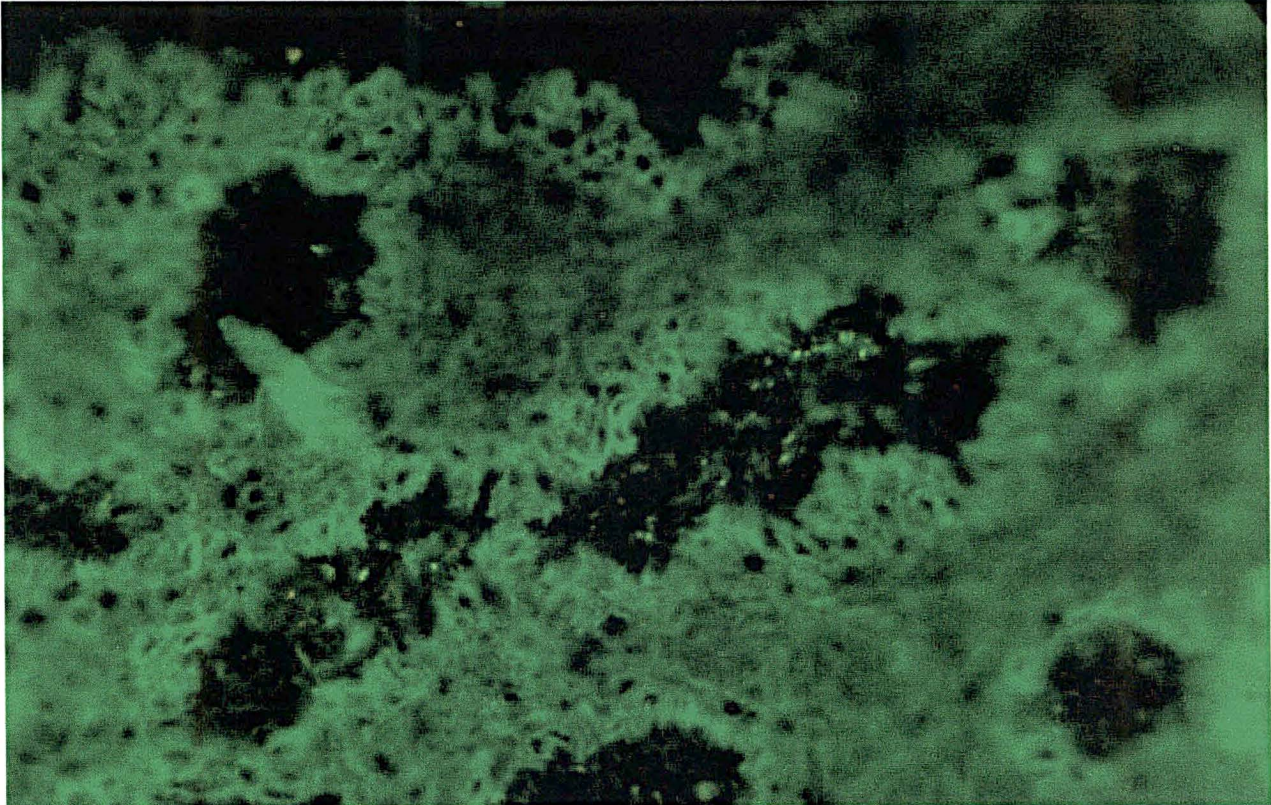


Figura 3. Epitélio das criptas da tonsila de um animal positivo para detecção de antígeno da Peste Suína Clássica, por imunofluorescência.

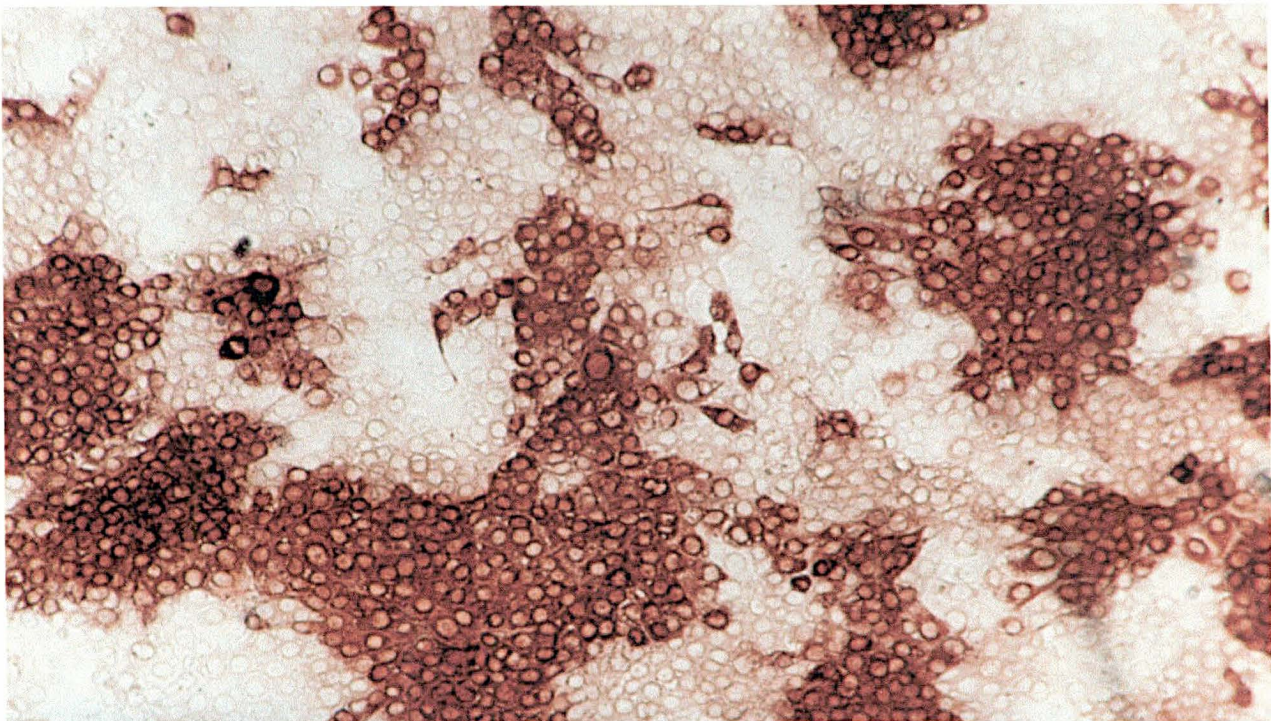


Figura 4. Monocamada celular da linhagem PK15 infectada com o Vírus da Peste Suína Clássica, fixada pelo calor e marcada por Imunoperoxidase (Microscópio invertido).



Figura 5. Monocamada celular da linhagem PK15, durante o processo de tripsinização.

A detecção de antígeno viral em cultivo celular da linhagem PK15 por IFI e IPX, foi possível após 15 horas de incubação e o título viral máximo encontrado a partir dos fragmentos de órgãos, após 48 horas de incubação, foi igual a $T=10^{4,11} / 50\mu\text{L}$ (1: 20.480) ou $T=10^{5,41}/\text{mL}$ (Figura 4).

As amostras de fragmentos de órgãos foram armazenadas no laboratório sob refrigeração em temperaturas variando de -20° a -80° C. Entre novembro de 1999 e abril de 2000, ou seja após dois anos de armazenamento, essas amostras foram retestadas, pelas técnicas de isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK15 e ELISA de captura de antígeno, confirmando os achados das provas iniciais, porém com diferente sensibilidade (Tabela 3).

Tabela 3. Detecção de antígeno em amostras de fragmentos de órgãos de suínos, recebidas e analisadas durante o foco de Peste Suína Clássica em 1997 e após dois anos.

Animal	Outubro 1997		Novembro 1999-Abril 2000	
	Imunoperoxidase e imunofluorescência	Isolamento viral	Isolamento viral	ELISA de captura de antígeno
Nº 1				
Tonsila	+	+	+	+
Baço			+	+
Linfonodo			+	+
Rim			+	+
Nº 3				
Baço	+	+	+	+
Intestino			+	+
Fígado			+	+
Linfonodo			+	+
Rim			-	+
Nº 4				
Tonsila	+	+	+	+
Baço			+	+
Intestino			+	+
Fígado			+	+
Rim			+	+
Nº 5				
Tonsila	+	+	-	+
Baço			+	+
Intestino			+	+
Fígado			+	+
Rim			-	+
Nº 6				
Tonsila	+	+	-	+
Baço			-	-
Bexiga			-	-
Fígado			-	-
Intestino			-	+
Rim			-	-
Nº 7				
Tonsilas	-	-	-	-
Nº 8				
Tonsila	+	+	+	+
Linfonodo			+	+

Tabela 4. Comparação entre as técnicas de ELISA e isolamento viral em cultivo celular, para detecção de antígeno em sete animais provenientes do foco de Peste Suína Clássica em 1997, em São Pedro do Iguazu, Paraná, Brasil.

	ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	18	0	18
ISOLAMENTO VIRAL			
Negativo	5	5	10
Total	23	5	28

Algumas amostras (3, 5 e 6) anteriormente positivas (outubro de 1997), foram negativas para isolamento viral em cultivo celular quando retestadas entre novembro de 1999 e abril de 2000, mas tiveram detecção de antígeno pela técnica de ELISA (Tabela 3). Na Tabela 3, estão também relacionados os resultados encontrados durante o primeiro isolamento viral (1997), a partir de fragmentos de tonsilas ou baço.

O mapeamento genético do vírus isolado no Paraná foi feito pelo ID-DLO (Institute for Animal Science and Health), na Holanda. O genoma deste vírus foi comparado a um painel padrão contendo variantes do genoma do VPSC. O resultado foi uma pequena correlação entre várias cepas, sendo que as maiores semelhanças observadas foram com a cepa Brescia (cepa de campo - alta virulência) e cepa China (cepa vacinal - avirulenta). Entretanto, o vírus isolado no foco do Estado do Paraná não pôde ser enquadrado em nenhuma das cepas em questão.

4.2. DETECÇÃO DE ANTICORPOS

4.2.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE ELISA E VIRUSNEUTRALIAZÇÃO (NPLA) EM ANIMAIS VACINADOS

Foi levado a efeito o estudo comparativo entre as técnicas de virusneutralização e ELISA em amostras de soro sanguíneo de uma propriedade vacinada clandestinamente em novembro de 1997. O estudo revelou que das 460 matrizes testadas 17 meses após a vacinação, 25,43% apresentaram títulos neutralizantes variando entre 1:20 e 1:480 na técnica de NPLA.

Com base nos resultados obtidos pela técnica de NPLA, a prevalência de animais soro-positivos foi de 117 em 460 animais (25,43%). A partir desses resultados, foi possível calcular a sensibilidade e especificidade relativas, os valores preditivos positivos e negativos da técnica de ELISA e a concordância de resultados entre as duas provas (Tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 5. – Base para cálculos comparativos entre a Virusneutralização e ELISA, de especificidade e sensibilidade relativas, e os valores preditivos negativo e positivo (OIE, 2000b).

		Virusneutralização		
		Positivos	Negativos	
ELISA	Positivo	A (VP)	C (FP)	A+B
	Negativo	B (FN)	D (VN)	B+D
	Total	A+B	C+D	A+B+C+D

VP= Positivos verdadeiros FP= Falsos positivos VN= Negativos verdadeiros FN= Falsos negativos

A sensibilidade do teste de ELISA foi calculada dividindo-se o número de soros positivos verdadeiros pela somatória dos positivos verdadeiros com os falsos negativos:

$$\text{Sensibilidade} = A / (A+B)$$

A especificidade foi calculada dividindo-se o número de soros negativos verdadeiros pela soma dos negativos verdadeiros com os falsos positivos:

$$\text{Especificidade} = D / (C+D)$$

O valor preditivo dos positivos foi obtido através da divisão do número de soros positivos verdadeiros, pela soma dos positivos verdadeiros com os falsos positivos:

$$\text{Valor preditivo dos positivos} = A / (A+C)$$

O valor preditivo dos negativos foi obtido pela divisão do número de soros negativos verdadeiros pela soma dos negativos verdadeiros com os falsos negativos:

$$\text{Valor preditivo dos negativos} = D / (B+D)$$

O grau de concordância entre as duas provas foi calculado somando-se todos os soros positivos verdadeiros e os negativos verdadeiros, divididos pelo número total de soros testados:

$$\text{Concordância} = A+D / A+B+C+D$$

A Tabela 6 refere-se aos resultados encontrados através da técnica de ELISA (amostras sem repetição) em relação à NPLA e os cálculos dos parâmetros para validação de um diagnóstico.

Das 460 amostras de soro provenientes das matrizes vacinadas os resultados encontrados pela técnica de NPLA foram de 117 positivos e 343 negativos (25,43%). As

mesmas amostras testadas pela técnica de ELISA resultaram em 116 positivos (5 FP) e 344 negativos(6 FN).

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos pela técnica de ELISA (amostras sem repetição) e virusneutralização para Peste Suína Clássica

		Virusneutralização (NPLA)		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivo	111(VP)	5(FP)	116
	Negativo	6(FN)	338(VN)	344
	Total	117	343	460

A concordância entre as duas provas, os valores de sensibilidade e especificidade relativas, e os valores preditivos positivo e negativo para a técnica de ELISA (sem repetição) foram:

$$\text{Sensibilidade} = 111 / 111+6 = 94,87\%$$

$$\text{Especificidade} = 338 / 338+5 = 98,54\%$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = 111 / 111+5 = 95,68\%$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = 338 / 338+6 = 98,25\%$$

$$\text{Concordância} = 111+338 / 460 = 97,60\%$$

A Tabela 7 refere-se aos resultados encontrados através da técnica de ELISA quando os soros foram testados em duplicata. Das 460 amostras de soro provenientes

das matrizes vacinadas os resultados encontrados pela técnica de NPLA foram de 117 positivos e 343 negativos. As mesmas amostras testadas pela técnica de ELISA em duplicata resultaram em 113 positivos (2 FP) e 347 negativos(6 FN).

Tabela 7. Comparação dos resultados obtidos na técnica de ELISA (amostras em duplicata) e virusneutralização para Peste Suína Clássica.

		Virusneutralização		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivo	111(VP)	2(FP)	113
	Negativo	6(FN)	341(VN)	347
	Total	117	343	460

A concordância entre as duas provas, os valores de sensibilidade e especificidade relativas e os valores preditivos positivo e negativo para a técnica de ELISA (em duplicata) foram:

$$\text{Sensibilidade} = 111 / 111+6 = 94,87\%$$

$$\text{Especificidade} = 341 / 341+2 = 99,41\%$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = 111 / 111+2 = 98,23\%$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = 341 / 341+6 = 98,27\%$$

$$\text{Concordância} = 111+338 / 460 = 98,26\%$$

Os seis soros falsos negativos na técnica de ELISA, ou seja, com percentagem de inibição menor que 30%, apresentaram baixos títulos de anticorpos neutralizantes, como pode ser observado na Tabela 8. Quando testados em duplicata na técnica de ELISA não houve mudança nos resultados.

Tabela 8. Amostras positivas para Peste Suína Clássica na virusneutralização e negativas na técnica de ELISA (Falsos negativos)

TÉCNICA	SOROS					
	1	2	3	4	5	6
TÍTULO NEUTRALIZAÇÃO	1:20	1:30	1:20	1:20	1:40	1:20
ELISA	<30%	<30%	<30%	<30%	<30%	<30%

Os soros falsos positivos na técnica de ELISA apresentaram títulos na NPLA considerados negativos, ou seja abaixo do ponto de corte da prova. Quando testados em duplicata na técnica de ELISA, o número de soros falsos positivos caiu de cinco para dois (Tabela 9), reduzindo a percentagem de falsos positivos de 1,08% para 0,43%.

Tabela 9. Amostras negativas para Peste Suína Clássica na virusneutralização e positivas na técnica de ELISA (Falsos positivos), e diagnóstico diferencial para Diarréia Bovina Viral (BVD)

TÉCNICAS	SOROS					POSITIVOS
	1	2	3	4	5	
TÍTULO NPLA-PSC	1:10	1:10	1:15	1:15	<1:5	0
ELISA SIMPLES	47%	70%	35%	42%	33%	5
ELISA DUPLICATA	45%	49%	29%	26%	29%	2
TÍTULO NPLA-BVD	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5	0

As 460 amostras provenientes dos animais vacinados foram testadas para BVD em NPLA, sendo que apenas quatro amostras apresentaram reação cruzada com PSC, porém em diluições muito baixas (1:20) quando comparadas às da NPLA (>1:120) para PSC (Tabela 10).

Tabela 10 Reações cruzadas entre as técnicas de virusneutralização (NPLA) para Peste Suína Clássica (PSC) e Diarréia Bovina Viral (BVD).

TÍTULOS NPLA	SOROS			
	1	2	3	4
PSC	1:240	1:120	1:480	1:320
BVD	1:20	1:20	1:20	1:20

Os resultados da técnica de ELISA são expressos em percentagem de inibição. Essa percentagem deriva do cálculo da absorbância da amostra testada em relação à absorbância de soro negativo de referência do teste (Tabela 11).

Apesar de não ser um parâmetro utilizado, a Tabela 11 mostra que existe uma boa correlação entre o título de anticorpos neutralizantes e a percentagem de inibição encontrada na técnica de ELISA (Figura 7).

Tabela 11. Soros positivos na técnica de ELISA agrupados conforme o título de anticorpos neutralizantes para o vírus da Peste Suína Clássica

TÍTULO NEUTRALIZAÇÃO	MÉDIA DE INIBIÇÃO ELISA (%)	NÚMERO DE SOROS
1:20	52,6	25
1:30	63,9	22
1:40	69,5	21
1:60	68,5	2
1:80	79,9	18
1:120	85,5	11
1:160	87,4	11
1:240	95,7	3
1:320	91,2	3
1:480	97,0	1

Conforme pode ser observado no Figura 6 aproximadamente 550 dias após a vacinação dos 111 animais positivos, apenas 7 animais apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes altos, entre 1:240 e 1:480, enquanto que 64 apresentaram títulos entre 1:20 e 1:60 e 40 com títulos entre 1:80 e 1:160.

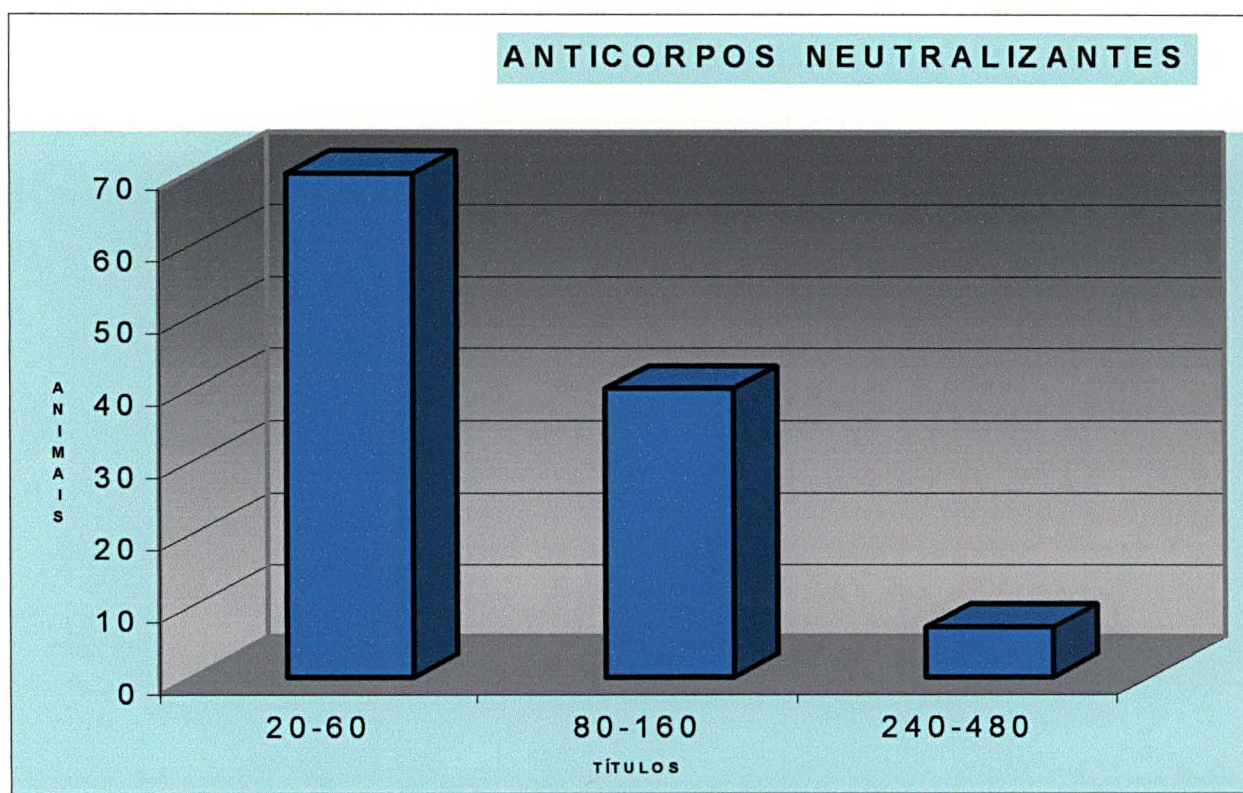


Figura 6. Total de animais positivos na detecção de anticorpos contra o vírus da Peste Suína Clássica, agrupado conforme os títulos de anticorpos neutralizantes encontrados na técnica de virusneutralização

Os coeficientes de correlação e regressão encontrados entre as percentagens de inibição obtidas dos soros positivos e os títulos de anticorpos neutralizantes na técnica de NPLA foram de 0,8245 e 0,9379 respectivamente (Figura 7).

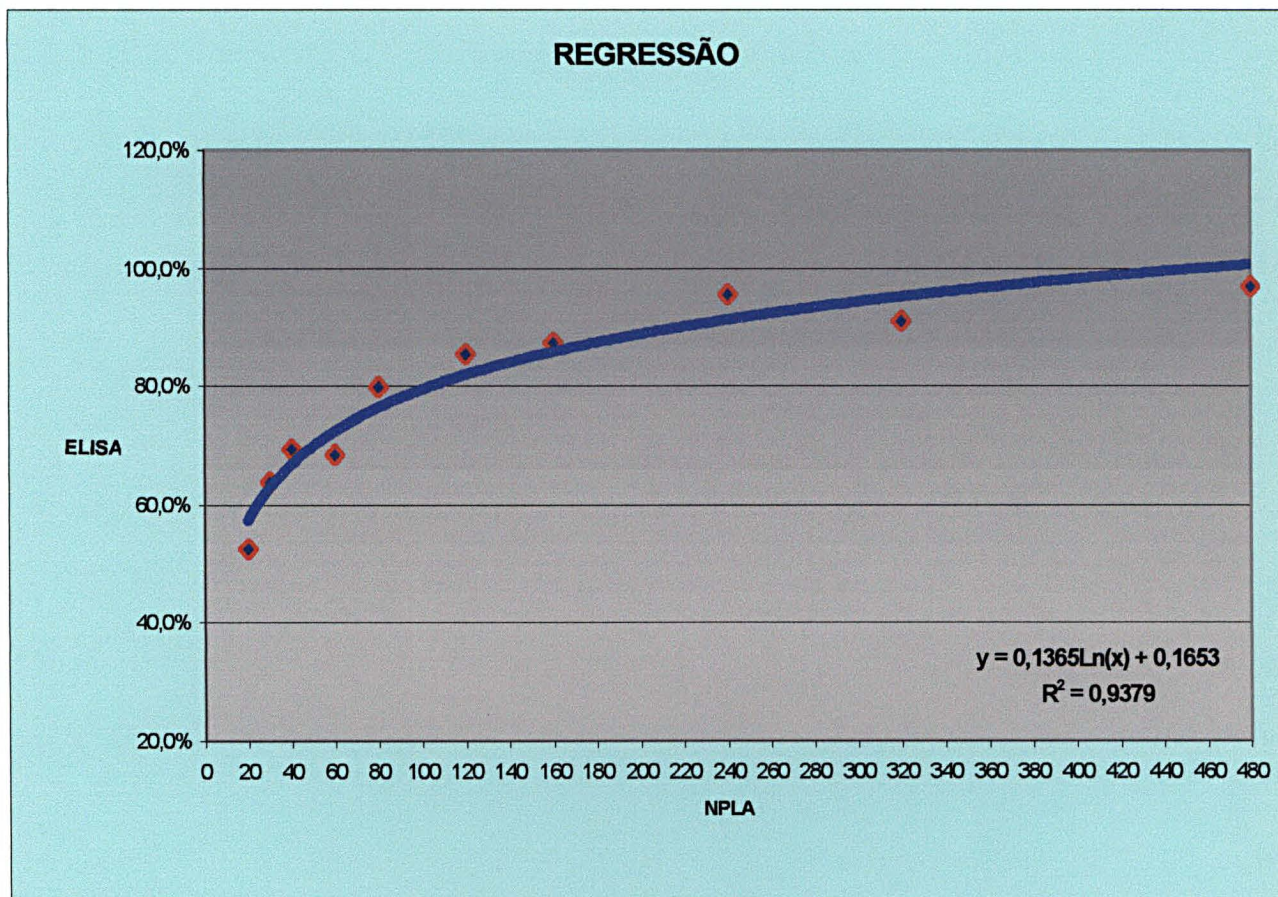


Figura 7 Curva de regressão entre as percentagens de inibição encontradas na técnica de ELISA em relação ao título de anticorpos neutralizantes pela técnica de virusneutralização para Peste Suína Clássica

4.2.2. RESULTADOS DE ANÁLISES SOROLÓGICAS PELA TÉCNICA DE ELISA NO REBANHO SUÍNO DO ESTADO DO PARANÁ.

Os resultados da sorologia em rebanhos suínos do Estado do Paraná incluem amostras provenientes da vigilância epidemiológica e monitorização das granjas de suínos credenciadas no período compreendido entre novembro de 1997 e junho de 2000, e ainda da sorologia perifocal realizada entre novembro de 1997 e março de 1998. Nesses resultados não estão incluídos as amostras provenientes dos animais do foco de PSC em 1997, bem como as amostras da granja vacinada (Tabela 12).

Os resultados relativos ao ano de 1997 foram obtidos através de um “kit” de ELISA policlonal, o qual apresentava alta sensibilidade, porém a especificidade foi relativamente baixa. O número de falsos positivos obtidos pela técnica de ELISA policlonal foi alto (Tabela 12), aproximadamente 37% (1432 amostras), as amostras foram confirmadas como falsas positivas quando testadas pelas técnicas de virusneutralização para PSC e BVD.

Em janeiro de 1998 foi registrado o primeiro “kit” monoclonal pelo Ministério da Agricultura, e os resultados obtidos desde então passaram a ter maior especificidade em relação à técnica de NPLA, ou seja, cerca de 0,4% de resultados falsos positivos no total de amostras testadas na triagem (Tabela 12).

Tabela 12. Sorologia do Estado do Paraná pela técnica de ELISA policlonal e monoclonal para detecção de anticorpos contra a Peste Suína Clássica (1997-2000).

TESTE	ANO	SOROS	FALSOS POSITIVOS	%
ELISA POLICLONAL	1997	3871	1432	37.00
ELISA MONOCLONAL	1998	11965	53	0.38
ELISA MONOCLONAL	1999	14837	85	0.418
ELISA MONOCLONAL	2000	5422	26	0.408
TOTAL	—	36095	1596	—

5. DISCUSSÃO

5.1. DETECÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL

Segundo VAN OIRSCHOT (1992), a primeira progênie do vírus da PSC, em cultivos celulares, é liberada das células 5-6 horas pós infecção. Sob condições de um ciclo normal de crescimento, há um aumento exponencial no título viral até 15 horas pós infecção, após o qual a replicação viral continua , em alto nível, por vários dias. Com base nestes dados, quinze horas pós infecção procedeu-se a revelação da primeira placa da prova de isolamento viral. Nesta primeira revelação já foi possível detectar vários sítios de replicação viral, confirmando o diagnóstico positivo obtido nos testes de IFI e IPX.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível detectar o antígeno viral dos fragmentos das tonsilas, rins, porção distal do íleo e baço confirmando os achados de VAN OIRSCHOT & TERPSTRA (1989) que citaram aqueles órgãos como os de eleição para o isolamento viral.

Segundo TERPSTRA (1976) *apud* VAN OIRSCHOT (1992), a partir de animais positivos, o isolamento viral é obtido com sucesso com uma frequência de 98%, 71%, 60% e 39% dos casos em tonsilas, porção distal do íleo, baço e rins, respectivamente.

O animal Nº 6 (Tabela 3) pode ser usado como exemplo destas afirmações, pois, seja por isolamento viral em cultivo celular ou ELISA de captura de antígeno, só foi possível detectar o antígeno viral a partir das amostras de tonsilas e de intestino (porção distal do íleo).

Estes achados reafirmam a importância da qualidade do material que é enviado ao laboratório, ressaltando-se que dependendo do estágio da doença e da cepa envolvida, o vírus só pode ser detectado nas tonsilas. As cepas de PSC de baixa virulência normalmente limitam-se à fase linfática, ficando portanto, confinadas às tonsilas e aos linfonodos regionais.

Nos animais Nº 3, 5 e 6 os melhores resultados para a detecção viral, após dois anos, foram encontrados através da técnica de ELISA de captura de antígeno, por independer da viabilidade do vírus em replicar-se, o que não se aplica ao isolamento viral em cultivo celular (Tabelas 3 e 4). Deve-se este fato principalmente ao modo de conservação a que as amostras estiveram submetidas. Sendo assim, a técnica de ELISA de captura de antígeno pode ser utilizada com maior segurança para materiais cuja conservação não tenha sido adequada, isso ocorre com maior frequência, na monitorização epidemiológica da PSC em suídeos silvestres, que muitas vezes são encontrados mortos impossibilitando o diagnóstico (LIPOWSKI, 1998).

Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas empregadas foram aditivos mostrando grande precisão para o diagnóstico da PSC.

Apesar da cepa isolada apresentar maiores semelhanças com a cepa Brescia e Cepa China, não pode ser enquadrado como nenhuma delas. A cepa Brescia é altamente virulenta, acometendo suínos de todas as idades, produzindo doença aguda e causando alta morbidade e mortalidade que, na maioria dos casos, chega a 100% do rebanho. Por outro lado, a cepa China é considerada avirulenta para suínos de todas as idades, incluindo fetos e animais imunossuprimidos com corticosteroides (VAN OIRSCHOT, 1980).

A cepa de vírus de PSC, isolada durante o foco de 1997 no Paraná, apresentou características de virulência enquadradas como moderada, uma vez que, em um mesmo grupo de animais, a incidência maior ocorreu naqueles mais jovens (leitões com idade inferior a três meses). Nesse grupo mais susceptível, também foram encontrados animais em fase de recuperação da doença, como foi o caso do animal N° 7 (Tabela 2), no qual o nível de anticorpos neutralizantes foi detectável (1:80), eliminando a presença de vírus viável para o isolamento em cultivo celular e para o ELISA de captura de antígeno. Os animais que apresentaram a manifestação clínica de forma mais aguda, com mortalidade entre 7 e 14 dias, não demonstraram anticorpos neutralizantes detectáveis, corroborando com os achados de VAN OIRSCHOT (1980).

5.2. DETECÇÃO DE ANTICORPOS

5.2.1. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE ELISA E VIRUSNEUTRALIZAÇÃO (NPLA) EM ANIMAIS VACINADOS

Segundo PANCA *et al.* (1997), animais vacinados contra a PSC aos 60 dias de idade apresentaram títulos máximos de anticorpos neutralizantes de 1:140 aos 120 dias após a vacinação, e de 1:50 aos 370 dias. Ao testar animais vacinados aos 80 dias de idade, os títulos foram de 1:180 aos 120 dias após a vacinação e de 1:256 aos 370 dias. Independente da idade de vacinação, todos esses animais quando infectados experimentalmente com o vírus da PSC mostraram proteção à reinfecção.

Dos 460 animais (matrizes) da propriedade trabalhada no presente estudo, 550 dias após a vacinação, 117 apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes variando entre 1:20 e 1:480 (Tabela 11).

A Tabela 11 mostra o número de animais que apresentou resultados positivos em cada uma das diluições.

Na Figura 6 os animais foram agrupados em três categorias, sendo que 59,82% dos animais apresentaram títulos entre 1:20 e 1:60, enquanto que, 34,18% entre 1:80 e 1:160 e no último grupo 5,98% dos animais com títulos altos entre 1:240 e 1:480.

A vacinação levada a efeito nessa propriedade foi clandestina sem nenhum critério, já que todos os animais da propriedade foram vacinados na mesma data, independente de idade ou de qualquer outro parâmetro.

Considerando que a taxa média de reposição anual de matrizes dessa propriedade foi de 50%, pode-se concluir que 100% dos animais vacinados apresentaram resposta imune após 550 dias, mesmo que em níveis baixos. A variação individual da resposta imune pode ser explicada pela diferença de faixa etária dos animais na data da vacinação.

Os resultados obtidos pela técnica de NPLA, revelaram uma prevalência de 25,43% de animais com anticorpos neutralizantes, ou seja 117 dos 460 animais estudados (Tabelas 6 e 7). Nos estudos comparativos entre as técnicas de NPLA e ELISA, esta com amostra simples, a sensibilidade e a especificidade relativas, e a concordância foram altas mostrando grande precisão da técnica de ELISA para detecção de anticorpos, uma vez que a técnica de NPLA é considerada a prova de referência (OIE, 2000a).

Quando as amostras foram testadas em duplicata na técnica de ELISA a especificidade aumentou em um ponto percentual, sem que a sensibilidade fosse comprometida. Esse aumento na especificidade não justifica que as amostras sejam sempre testadas em duplicata, pois além de dobrar o custo, não oferece maior segurança, uma vez que todos os soros positivos na técnica de ELISA são submetidos à confirmação na técnica de NPLA e que os resultados falsos negativos é que representam um risco maior.

Em situações onde a prevalência da doença é muito baixa, a segurança do teste é conferida por um aumento na sensibilidade do teste ou no tamanho da amostra (MARTIN *et al.*, 1992; MÜLLER *et al.*, 1996).

A especificidade da técnica de ELISA encontrada no presente estudo variou entre 98,54% e 99,41%, conforme o número de repetições da amostra de uma para duas respectivamente. O ELISA-CSFV foi analisado no ID-DLO (Institute for Animal Science and Health) durante o último foco de PSC ocorrido na Holanda, no final do ano de 1997 e início de 1998, quando foram testadas 1.800.000 amostras de soro e a especificidade da prova variou entre 99,9% para animais jovens e 97,9% para animais adultos. A diminuição da especificidade para amostras de animais adultos foi devida ao maior risco de infecção por outros *Pestivirus* nessa faixa etária (BLOEMRAAD *et al.*, 1998).

O total de amostras com diagnóstico falso negativo pela técnica de ELISA, na propriedade vacinada foi de 1,30% e ocorreu em soros com baixos títulos de anticorpos neutralizantes na NPLA, justificando assim o baixo percentual de inibição encontrado no ELISA (Tabela 8).

As cinco amostras com resultado falso positivo foram testadas para a presença de anticorpos neutralizantes contra o BVDV e o resultado foi negativo, podendo-se descartar dessa forma a possibilidade de reação cruzada (Tabela 9).

Apenas 4 dos 117 soros positivos para a presença de anticorpos contra VPSC apresentaram reação cruzada para BVDV na virusneutralização, ainda com títulos muito baixos quando comparados aos encontrados para VPSC (Tabela 10). Em uma prova de virusneutralização cruzada, considera-se positivo o diagnóstico que apresentar um título no mínimo quatro vezes maior (OIE, 2000a). Nesse caso, como os títulos de anticorpos neutralizantes contra BVDV foram de 1:20 nos quatro soros testados e para o VPSC foram entre 1:120 e 1:480, ficou confirmado que tratava-se de anticorpos específicos contra o VPSC.

O pequeno número de reações cruzadas na técnica de NPLA pode ser explicado nesse caso, pois a imunidade desses animais foi conferida por vacinação e segundo VAN OIRSCHOT (1980), as reações sorológicas cruzadas entre BVD e PSC ocorrem mais freqüentemente quando se trata de cepas de PSC de baixa virulência. Cepas altamente virulentas e cepas vacinais atenuadas apresentam pouca reação cruzada (KAMIJO *et al.*, 1977).

Apesar da técnica de ELISA não ser uma prova quantitativa, conforme mostra a Figura 7, a técnica de ELISA-CSFV apresentou bom coeficiente de correlação entre as percentagens de inibição e os títulos de anticorpos neutralizantes, sendo que os maiores desvios foram encontrados nas diluições mais baixas, de 1:20, 1:30 e 1:40 (Tabela10).

5.2.2. RESULTADOS DE ANÁLISES SOROLÓGICAS PELA TÉCNICA DE ELISA NO REBANHO SUÍNO DO ESTADO DO PARANÁ.

O "kit" de ELISA para diagnóstico sorológico da PSC utilizado no ano de 1997 foi policlonal, sendo que sua alta sensibilidade comprometia a especificidade do teste, resultando em grande número de falsos positivos (Tabela12). Em razão desse fato, a quantidade de soros para reteste na técnica de NPLA para BVD e PSC foi alta (1432 amostras).

As provas de NPLA, além de serem laboriosas e demorarem para a obtenção do resultado (3-5 dias) em comparação à técnica de ELISA (2-3 horas) (BLOEMRAAD *et al.*, 1998), apresentam um custo por amostra, em média dez vezes maior, já que necessitam da manutenção de um cultivo celular que inclui estufa de CO₂, meios de cultivo

importados, garrafas estéreis para cultivo, antibióticos, soro fetal bovino, manutenção da cepa viral, banco de células em N₂ líquido, microplacas de poliestireno e anticorpos conjugados.

A partir de janeiro de 1998, quando se passou a utilizar a técnica de ELISA monoclonal, o número de falsos negativos diminuiu consideravelmente (Tabela 12). Não foi possível calcular a sensibilidade e a especificidade do ELISA nas amostras da sorologia geral (36.095 amostras) porque a técnica do ELISA foi utilizada como prova de triagem. Portanto, apenas as amostras que se mostraram positivas na técnica de ELISA foram testadas pela técnica de NPLA para PSC e BVD.

Tendo em vista que no Estado do Paraná o Programa de Erradicação da PSC, encontra-se em fase final a prevalência da doença é considerada, para efeitos de cálculos de amostragem entre 0,5 e 2%.

A sensibilidade de um teste de ELISA usado para detectar soros positivos para PSC em rebanhos suínos com baixa prevalência da doença é muito importante (DE SMIT *et al.*, 1999b). É sabido que os testes de ELISA padronizados até então não são tão sensíveis quanto a virusneutralização (MÜLLER *et al.*, 1997), a sensibilidade desses testes varia entre 85 e 98% (WENSVOORT *et al.*, 1988; MOSER *et al.*, 1996; COLIJN *et al.*, 1997; MÜLLER *et al.*, 1997). Todavia, um pequeno aumento no volume da amostragem de um rebanho pode assegurar a detecção de suínos infectados, mesmo em baixas prevalências (MARTIN *et al.*, 1992). Desta forma, uma pequena diferença na sensibilidade do teste de ELISA quando comparada com a da virusneutralização, é de pouca importância, se o tamanho da amostra for adequado (DE SMIT *et al.*, 1999b).

A especificidade é de grande importância, uma vez que os resultados positivos na técnica de ELISA devem ser confirmados na prova de virusneutralização, na qual o resultado pode ser ambíguo quando existe a possibilidade de BVDV e BDV no rebanho testado (WENSVOORT *et al.*, 1994; DE SMIT *et al.*, 1999b).

Não é improvável que uma grande percentagem de soros classificados como negativos na virusneutralização, contenha anticorpos neutralizantes contra BVDV e BDV, se bem que os títulos de anticorpos podem não ser detectados, algumas vezes por diferenças antigênicas entre a cepa de campo em questão e a cepa viral utilizada na técnica da neutralização (DEKKER *et al.*, 1995). Portanto se um número significativo de soros de uma mesma propriedade resultar em altas percentagens de inibição na técnica de ELISA, é prudente uma nova amostragem com colheita inclusive de material para isolamento viral, para excluir a possibilidade de PSC.

Deve-se reconhecer que os prejuízos causados pela introdução do vírus da PSC em áreas já decretadas livres e com alta densidade de granjas de suínos, é muito grande, e que mesmo em condições excelentes de vigilância e controle é difícil eliminar por completo essa possibilidade. Pode ser usado como exemplo o caso da Holanda que durante o último foco de PSC, sacrificou e incinerou mais de 10.000.000 de animais.

Existe entretanto, uma grande preocupação no âmbito internacional sobre esse problema. Dessa forma a pesquisa no intuito de desenvolver uma vacina recombinante que se mostre eficiente, segura e que permita a diferenciação entre anticorpos conferidos pela vacinação ou por cepas de campo do vírus da PSC, tem sido motivo de inúmeros trabalhos (HULST & MOORMANN, 1996; SCHRIJVER, 1998; BOUMA *et al.*, 1999; CHENUT *et al.*, 1999; RIJN *et al.*, 1999; HAMMOND *et al.*, 2000).

6. CONCLUSÕES

1) Realizamos um estudo da prevalência da Peste Suína Clássica no Estado do Paraná, que seguiu as normas internacionais obtendo resultados compatíveis aos encontrados em centros de referência.

2) Para a detecção de antígeno, a técnica de ELISA apresentou melhores resultados do que o isolamento viral em cultivos celulares, quando as condições de conservação da amostra comprometiam a viabilidade do vírus para a replicação.

3) Para a detecção de anticorpos, a concordância dos resultados entre a técnica de ELISA e a de virusneutralização (prova de referência) foi de 98,26%, e os valores relativos de sensibilidade e especificidade foram de 94,87 e 99,41% respectivamente. Estes resultados reafirmam a segurança da utilização desse kit de ELISA para o diagnóstico sorológico da PSC, na manutenção do Programa de Erradicação da PSC no Estado do Paraná.

4) Na técnica de ELISA para detecção de anticorpos, nenhum dos soros com resultado falso positivo foi determinado pela presença de anticorpos contra Diarréia Bovina Viral.

5) Na granja que realizou vacinação clandestina todos os animais apresentaram anticorpos em títulos que conferem proteção à reinfecção, após 17 meses.

6) O estudo sorológico de 36.507 suínos pelas técnicas mencionadas permite afirmar a ausência de PSC no Estado do Paraná.

7) Esse estudo demonstra a importância dessas técnicas na vigilância epidemiológica dentro do Programa de Controle e Erradicação da PSC, tanto no Paraná como no resto do país.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATCC, American Type Culture Collection. **Search Catalogs**. University Boulevard, Manassas, 2000.

AYNAUD, J. M. Etude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine. **Recherches Vétérinaires**, n. 1, p. 25-36, 1968.

BITSCH, V. An investigation into the basic virus-antibody neutralization reaction, with special regard to the reaction in the constant-virus / varying-serum neutralization test. **Acta Vet. Scand.**, n.19, p. 110-128, 1978.

BLOEMRAAD, M. Detection and differentiation of pestiviruses isolated from pigs within the framework of classical swine fever. **Laboratory Manual of Diagnostic Procedures for Classical Swine Fever**. Institute for Animal Science and Health. Lelystad - Netherlands, 1997.

BLOEMRAAD, M.; KOENEN, M.E.; VAN ROOIJ, E.; DE SMIT, H. Functional properties of an ELISA for the detection of classical swine fever antibodies and its use as a screening test during the 1997 classical swine fever epizootic in the Netherlands. **ID-DLO Annual Report**, 1998.

BOUMA, A.; DE SMIT, A.J.; KLUIJVER, E.P.; TERPSTRA, C.; MOORMANN, R.J.M.
Efficacy and stability of a vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 101-114, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO E REFORMA AGRÁRIA.
Peste Suína Clássica. **Boletim de defesa sanitária animal**, Brasília, n. especial, 1980.

BRASIL, Portaria Ministerial nº 075, de 26 de março de 1992. Declara área sob controle sanitário com a implantação do "Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica", os municípios contíguos dos estados do Paraná, Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 mar. 1992a.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Ed.). **Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica**. Brasília, 1992b.

BRASIL, Portaria Ministerial nº 201, de 15 de maio de 1998. Declara livres de Peste Suína Clássica os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso. **Diário Oficial da União**, Brasília, 15 de maio de 1998. 95, p.36.

CARBREY, E.A.; STEWART, W.C.; KRESSE, J.I. *et al.* Natural Infection of Pigs with Bovine Viral Diarrhea Virus and its Differential Diagnosis from Hog Cholera. **J.Am.Vet.Ass.**, v. 169, p. 1217-1219, 1976.

CASTRO, M.D.; STOFFREGEN, W.C.; BRIGMAN, G.P. *et al.* A method to detect bovine viral diarrhoea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining. **J.Vet.Diagn.Invest.**, n.9, p. 427-431, 1997.

- CEE. Processos de Diagnóstico para Confirmação do Diagnóstico Diferencial da Peste Suína Clássica. In: **Jornal Oficial das Comunidades Européias**, 1991. n. 189, p. 50-55.
- CHENUT, G.; SAINTILAN, A.F.; BURGER, C.; ROSENTAL, F; CRUCIERE, C.; PICARD, M.; BRUYERE, V.; ALBINA, E. Oral immunisation of swine with a classical swine fever vaccine (Chinese strain) and transmission studies in rabbits and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 265-276, 1999.
- COGGINS, L.; BAKER, J.A. Standardization of Hog Cholera neutralization test. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, n. 105, p. 408-412, 1964.
- COLIJN, E.O.; BLOEMRAAD, M.; WENSVOORT, G. An improved ELISA for detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, n. 59, p. 15-25, 1997.
- CORTHIER, G. Cellular and humoral immune response in pigs given vacinal and chronic hog cholera viruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 11, p.1841-1843, 1978.
- DAHLE, J.; MOENNIG, V.; COULIBALY, C.Z.; LIESS, R. Clinical, post mortem and virological findings after simultaneous inoculation of pigs with hog cholera and bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Medicine, B**, v. 38, n. 10, p. 764-772, 1991.
- DAHLE, J.; SCHAGEMANN, G.; MOENNIG, V.; LIESS, B. Clinical, virological and serological findings after intranasal inoculation of pigs with bovine viral diarrhoea virus and subsequent intranasal challenge with hog cholera virus. **Journal of Veterinary Medicine, B**, v. 40, p. 46-54, 1993.

- D'APICE, A.M. Peste Suína (Hog Cholera). Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura, Instituto Biológico, São Paulo, **Folheto** nº104, 28 p., 1945.
- DARBYSHIRE, J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. **Veterinary Record.**, v. 72, n. 17, p. 331, 1960.
- DE SMIT, A.J.; BOUMA, A.; TERPSTRA, C.; VAN OIRSCHOT, J.T. Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination. **Veterinary Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 239-249, 1999.
- DE SMIT, A.J.; EBLÉ, P.L.; KLUIJVER, E.P.; BLOEMRAAD, M.; BOUMA, A. Laboratory decision-making during the classical swine fever epidemic of 1997-1998 in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 42, p. 185-199, 1999.
- DEKKER, A.; WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. Six antigenic groups within the genus *pestivirus* as identified by cross-neutralization assays. **Veterinary Microbiology**, v. 47, n. 3-4, p. 317-329, 1995.
- DEPNER, K.R.; HINRICHS, U.; BICKHARDT, K. *et al.* Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection. **Veterinary Record**, n. 140, p. 506-507, 1997.
- DUNNE, H.W.; HOKANSON, J.F.; LUEDKE, A.J. The pathogenesis of Hog Cholera. I. Route of entrance of the virus into the animal body. **American Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 77, p. 613-618, 1959a.
- DUNNE, H.W.; LUEDKE, A.J. The pathogenesis of hog cholera. II. The virus eclipse phase and sensitization of the host. **American Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 77, p. 619-624, 1959b.

- EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v. 122, p.501-504, 1955.
- EDWARDS, S. Hog cholera and African swine fever in Europe. **Pig Veterinary Journal**, v. 25, p. 9-16, 1990.
- EDWARDS, S.; MOENNIG, V.; WENSVOORT, G. The development of an international reference panel of monoclonal antibodies for the differentiation of hog cholera virus from other pestiviruses. **Veterinary Microbiology**, n. 29, p. 101-108, 1991.
- EDWARDS, S.; PATON, D. Antigenic differences among pestiviruses. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 563-577, 1995.
- ERICKSON, G.A. Hog Cholera. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnosis Virology**. Mosby - Year Book, 1992. p. 228-230.
- ESKILDSEN, M.; OVERBY, E. Serological diagnosis of swine fever. A comparison of a modified direct complement fixation test with an immunofluorescence plaque neutralization test in the diagnosis of experimental subclinical infection. **Acta Vet. Scand.**, n. 17, p. 131-141, 1976.
- FAO / RLAC. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación / Oficina Regional para America Latina y el Caribe. **Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico**, Casilla, Santiago, Chile, 1992.
- FREITAS, T.R.P. **Peste Suína Clássica : Diagnóstico no Brasil**. Encontro de Virologia. Porto Alegre – Brasil, 1993.
- HAMMOND, J.M.; McCOY, R.J.; JANSEN, E.S.; MORRISSY, C.J.; HODGSON, C.J.; JOHNSON, M.A. Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus

expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. **Vaccine**, n. 18, p. 11-12, 2000.

HARRIS, R.J.C. **Techniques in Experimental Virology**. New York : Academic Press, 1964. p. 177-180.

HOLM JENSEN, M. Detection of antibodies against Hog Cholera Virus and Bovine Viral Diarrhea Virus in porcine serum. **Acta Vet. Scan.**, n. 22, p. 85-98, 1981.

HULST, M.M. & MOORMANN, R.J.M. Classical swine fever diagnostics and vaccine production in insect cells. **Cytotechnology**, n. 20, p. 271-279, 1996.

KAMIJO, Y.; OHKUMA, S.; SHIMIZU, M.; SHIMIZU, Y. Differences in pathogenicity and antigenicity among hog cholera virus strains. **National Institute of Animal Health Quarterly**, n. 17, p. 133 – 140, 1977.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JONDA, W.M. *et al.* Laboratory Diagnosis of Viral Disease. In: KONEMAN, E.W. **Diagnostic Microbiology**. New York: Lippincott-Raven Publishers, 1992. p. 228-232.

KRAMPS, J.A.; VAN ROOIJ, E.M.A. Validation, standardization and control of ELISA techniques for the diagnosis of infectious diseases in veterinary medicine. **International Atomic Energy Agency**, 348 / 22, 1998.

KRETZDORN, D. Modern vaccination concepts against Classical Swine Fever. **OIE Symposium On Classical Swine Fever**. Birmingham – UK, 1988.

LAEVENS, H.; KOENEN, F.; DELUYKER, D. *et al.* An experimental infection with classical swine fever virus in weaner pigs. I. Transmission of the virus, course of the disease, and antibody response. **Veterinary Quarterly**, n. 20, p. 41-45, 1998.

- LAEVENS, H.; KOENEN, F.; DELUYKER, D. *et al.* Experimental infection of slaughter pigs with classical swine fever virus, course of the disease and antibody response. **Veterinary Record**, n.145, p. 243-248, 1999.
- LIESS, B.; FREY, H.R.; HAFEZ, S.M.; ROEDER, B. Detection of neutralising antibodies (NIF test): use of new technical equipment (CCSC System) for laboratory swine fever diagnosis. In : **CEC Report on diagnosis and Epizootiology of Classical Swine Fever and African Swine Fever**, EUR, 5486, p. 187-197, 1976.
- LIPOWSKI, A.; MOKRZYCKA, Z.; PEJSAK, Z. The detection of Hog Cholera Virus from autolysed meat and organ samples. **OIE Symposium On Classical Swine Fever**. Birmingham - UK, 1998.
- MARTIN, S.W.; SHOUKRI, M.; THORBURN, A. Evaluating the health status of herds on tests applied to individuals. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 14, p. 33-43, 1992.
- MENGELING, W.L.; PACKER, R.A. Pathogenesis of chronic hog cholera: Host response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 3, p. 409-417, 1969.
- MEYERS, G.; THIEL, H.J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. **Virology**, n. 171, p. 555-567, 1989.
- MIHAITA, S.; TORTOCEA, N.; POPA, M.; ALBU, T. Recherches sur la persistance du virus suipestique lapinisé "C" dans l'organisme des porcs vaccinés. **Bull. Off. Int. Epiz.**, n.72, p. 885-897, 1969.
- MOENNIG, V.; SHAGEMANN, G.; DAHLE, J.; GREISER-WILKE, I. AND LEDER, L. A new approach for the diagnosis of Hog Cholera. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, n. 97, p. 91-93, 1990.

- MOORMANN, R.J.M.; WARMERDAM, P.A.M.; VAN DER MEER, B. *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region encoding envelope protein E1. **Virology**, n. 177, p. 184-198, 1990.
- MOSER, C.; RUGGLI, N.; TRATSCHIN, J.D.; HOFMANN, M.A. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2. **Veterinary Microbiology**, n. 51, p. 41-53, 1996.
- MÜLLER, A.; DEPNER, K.R.; LIESS, B. Evaluation of a gp 55 (E2) recombinant-based ELISA for the detection of antibody induced by classical swine fever virus. **Deutsche Tierärzteiche Wochenschrift**, n. 103, p. 451-453, 1996.
- MÜLLER, T.; DEPNER, K.R.; BUROW, J.; AHL, R.; CONRATHS, F.J.; MOENNIG, V. Comparison of different BVBV-strains for their use in differential diagnosis of classical swine fever – an attempt to standardize the neutralization test. **Deutsche Tierärzteiche Wochenschrift**, n. 104, p. 91-96, 1997.
- OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Classical Swine Fever. **Manual of Standards**, cap. 2.1.13, 2000a.
- OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. **Manual of Standards**, cap. 1.3, 2000b.
- PANCA, C.; POPA, M.; POTECEA, E.; PAMBUCOL, R.; PAVUL, I.V.; DOLEAK, R. Post vaccinal antibody dynamics depending on various vaccination schemes in classical swine fever. **Studies and Researches in Veterinary Medicine**, n. 5, p. 35-40, 1997.

- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti". **Relatórios mensais de diagnósticos**, 1993-1997. Curitiba, 1993-1997.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti". **Laudo Oficial nº 2626/97**. Curitiba, 1997a.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Sanidade Animal. **Formulários de Envio de Material**, 1997. Curitiba, 1997b.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Setor de Epidemiologia. **Relatório Técnico-epidemiológico sobre o episódio de Peste Suína Clássica no Estado do Paraná**, 1997. Curitiba, 1997c.
- PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural – DCA. **Diagnóstico Pecuário**, 1999. Curitiba, 1999.
- PATON, D.J.; SANDS, I.J.; LOWINGS, I.P.; SMITH, J.E.; IBATA, G.; EDWARDS, S. A proposed division of the *pestivirus* genus using monoclonal antibodies, supported by cross-neutralization assay and genetic sequencing. **Veterinary Research**, n. 26, p. 92-109, 1995.
- PEARSON, J.E. Hog Cholera diagnostic techniques . **Comparative Immunology**, v.15, n. 3, 213-219, 1992.
- PIRTLE, E.C. A soluble precipitating antigen (HCA) from hog cholera virus propagated in tissue culture. II. Incidence of HCA antibodies in sera of hog cholera immune and non-immune swine. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, n. 28, 297-303, 1965.

- POTGIETER, L.N.D. Bovine Viral Diarrhea. In: CASTRO, A.E.; HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnosis Virology**. Mosby - Year Book, 1992. p. 88-92
- RESSANG, A.A.; DEN BOER, J.L. The indirect fluorescent antibody technique as a method for detecting serum antibodies against hog cholera. Part 1. An outline of the technique and its preliminary evaluation. **Zentralblatt fur Veterinaermedizin Reihe B**, n.16, p. 709-716, 1969.
- RESSANG, A.A. Studies on the pathogenesis of hog cholera. **Zentralblatt fur Veterinaermedizin Reihe B**, n. 20, p. 256-271, 1973.
- RIJN, P.A.; GENNIP, H.G.P.; MOORMANN, R.J.M. An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus. **Vaccine**, v. 17, n. 5, p. 433-440, 1999.
- ROWE, C.A.; ROMERO, C.H. **Um Procedimento para a Reutilização de Material Plástico para Culturas Celulares**. EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisas Agropecuárias de Suínos e Aves, Concórdia, n. 13, p.1-9, 1987.
- SAKODA, Y.; YAMAGUCHI, O.; FUKUSHO, A. A new assay for Classical Swine Fever Virus based on cytopathogenicity in porcine kidney cell line FS-L3. **Journal of Virological Methods**, n. 70, p. 93-101, 1998a.
- SAKODA, Y.; HIKAWA, M.; TAMURA, T.; FUKUSHO, A. Establishment of a serum-free culture cell line, CPK-NS, which is useful for assays of classical swine fever virus. **Journal of Virological Methods**, v. 75, n. 1, p. 59-68, 1998b.
- SAUNDERS, G. C. Development and evaluation of an enzyme-labelled antibody test for rapid detection of Hog Cholera antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, n. 38, p.21-25, 1977.

SCHNEIDEREIT, M. The implications of classical swine fever for the biological industry. **OIE Symposium on Classical Swine Fever**. Birmingham - UK, 1998.

SCHRIJVER, R. Standard vaccines and tests have the future. **ID-DLO Annual Report**, p.14-15, 1998.

SCHRIJVER, R.S. & KRAMPS, J.A. Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbent assay formats. **Ver. sci. Tech. Off. int. Epiz.**, v. 17, n. 2, p. 550-561, 1998.

SILVA, B.B. Peste Suína. In : **Boletim da Agricultura do Estado de São Paulo**, n. único, p. 1-34, 1949.

SOBESTIANKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. *et al.* Peste Suína Clássica. In: SOBESTIANKY, J.; BARCELLOS, D.; MORES, N. *et al.* **Clinica e Patologia Suína**. 2.ed. Goiânia : J.Sobestiansky, 1999. p. 341-349.

TERPSTRA, C. Detection of C-strain virus in pigs following vaccination against swine fever. **Tijdschr. Diergeneesk.**, n. 103, p. 678-684, 1978a.

TERPSTRA, C. The use of immunoelectro-osmophoresis as a possible aid in the diagnosis of swine fever. **Zentralblatt fur Veterinaermedizin Reihe B**, n. 25, p. 576-585, 1978b.

TERPSTRA, C. Epizootiology of swine fever. **Veterinary Quarterly**, n. 9, p. 50-60, 1987.

TERPSTRA, C Hog cholera: an update of present knowledge. **British Veterinary Journal**, v. 147, n. 5, p. 397-406, 1991.

- TERPSTRA, C.; BLOEMRAAD, M.; GIELKENS, A.L.J. The neutralising peroxidase-linked assay for detection of antibody against classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, n. 9, p.113-120, 1984.
- TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever. **Research in Veterinary Science**, n. 45, p. 137-142, 1988.
- TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. A congenital persistent infection of bovine virus diarrhoea virus in pigs: clinical, virological and immunological observations. **Veterinary Quarterly**, n. 19, p. 97-101, 1997.
- THE, T.H.; FELTKAMP, T.E.W. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. **Immunology**, n. 18, p. 865-873, 1970a.
- THE, T.H.; FELTKAMP, T.E.W. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. II. A reproducible method. **Immunology**, n. 18, p. 875-881, 1970b.
- THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., *et al.* **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1996. p. 1059-1073.
- VALLE, A.L. Súmula da Campanha Contra a Peste Suína. **Boletim da Divisão de Defesa Sanitária**, n. 1, p. 3-21, 1951.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. I. Clinical, pathological and virological observations. **Veterinary Microbiology**, n.4, p. 117-132, 1979a.

- VAN OIRSCHOT, J.T. Experimental production of congenital persistent swine fever infections. II. Effect on functions of the immune system. **Veterinary Microbiology**, n.4, p. 133-147, 1979b.
- VAN OIRSCHOT, J.T. **Persistent and inapparent infections with swine fever virus of low virulence. Their effects on the immune system.** Utrecht, 1980. PHD Thesis – State University of Utrecht.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Congenital infections with non-arbo Togaviruses. **Veterinary Microbiology**, n. 8, p. 321-361, 1983.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Hog Cholera. In: LEMAN, A.D *et al.* **Disease of Swine.** Ames, Iowa, 1992. p. 274-285.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; TERPSTRA, C. A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical and virological observations. **Veterinary Microbiology**, n.2, p.121-132, 1977a.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; TERPSTRA, C. A congenital persistent swine fever infection. II. Immune response to swine fever virus and unrelated antigens. **Veterinary Microbiology**, n.2, p.133-142, 1977b.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; TERPSTRA, C. Virus infectious of porcine In: HORZINEK, M.E. **Virus infectious of vertebrates.** Elsevier Science Publishers B.V., 1989. p. 113-130.
- VANNIER, P.; LEFORBAN, Y.; CARNERO, R. *et al.* Contamination of a live virus vaccine against pseudorabies (Aujeszky's disease) by an ovine *pestivirus* pathogen for the pig. **Ann. Rech. Vet.**, n. 19, p. 338-290, 1988.

- VIDOR, T. Patogenia e Imunoprofilaxia da Peste Suína Clássica. **Simpósio do CNPSA e Simpósio Catarinense de Sanidade Suína**. Concórdia - Brasil, 1980.
- WENGLER, G. Family Flaviviridae. In: FRANCKI, R.I.B., FAUQUET, C.M., KNUDSON, D.L., BROWN, F., (Eds.). **Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Springer Verlag, Viena, 1991. p. 223-233.
- WENSVOORT, G.; BLOEMRAAD, M.; TERPSTRA, C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. **Veterinary Microbiology**, n. 17, p. 129-140, 1988.
- WENSVOORT, G.; BOONSTRA, J.; BODZINGA, B.G. Immunoaffinity purification and characterization of the envelope protein E1 of hog cholera virus. **Journal of General Virology**, n. 71, p. 531-540, 1990.
- WENSVOORT, G.; DE SMIT, A.J.; TERPSTRA, C. A non-CSFV pestivirus is currently circulating among a number of Dutch pig herds and causing false positive CSFV serology. In: **Report on the Meeting of the National Swine Fever Laboratories**, (24-25 November 1994), Brussels, p. 22-24, 1994.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C. Bovine viral diarrhoea virus infections in piglets born to sows vaccinated against swine fever with contaminated vaccine. **Research in Veterinary Science**, n. 45, p. 143-148, 1988.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; BOONSTRA, J.; BLOEMRAAD, M.; VAN ZAANA, D. Production of monoclonal antibodies against swine fever virus and their use in laboratory diagnosis. **Veterinary Microbiology**, n. 12, p. 101-108, 1986.

- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUYVER, E.P. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. **Veterinary Microbiology**, n. 20, p. 291-306, 1989a.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUYVER, E.P., *et al.* Antigenic differentiation of *pestivirus* strains with monoclonal antibodies against hog cholera virus. **Veterinary Microbiology**, n. 21, p. 9-20, 1989b.
- WILSON, M.B.; NAKANE, P.K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: KNAP, W.; HOLUBAR, K.; WICK, G. **Immunofluorescence and related staining techniques**. Amsterdam : Elsevier-Biomedical Press, 1978. p. 215-224.