

DISTRIBUIÇÃO E PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS PRECIPITANTES PARA O VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY EM PLANTÉIS SUÍNOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA¹

CARLOS H. ROMERO², CHERYL ANN ROWE², GILBERTO I. PROVENZANO³, ROBIS S. FLORES², LIANA BRENTANO²
E JOSÉ LUIZ L. MARQUES²

ABSTRACT.- Romero C.H., Rowe C.A., Provenzano G.I., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1984. [Distribution and prevalence of precipitating antibodies to Aujeszky's disease virus in swine herds in the State of Santa Catarina.] Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky em plantéis suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 4(4): 123-127. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves, Embrapa, Cx. Postal D-3, Concórdia, SC 89700, Brazil.

A sero-epidemiological survey utilizing the plate immunodiffusion (ID) test for the detection of antibodies in the serum to Aujeszky's disease virus (ADV) was performed in swine herds in the State of Santa Catarina. A total of 9303 sera were tested of which 6521 sera were obtained from 67 (89,3%) of 75 existing breeding herds in Santa Catarina distributed in 30 municipalities. Sixty four (1%) of the latter sera belonging to six herds contained detectable antibodies, with clinical Aujeszky's disease (AD) being diagnosed in two of the herds. Similar ID tests performed on sera obtained from 377 young shoats from five of six Pedigree Testing Stations existing in Santa Catarina and distributed in five municipalities were all negative, while four infected boars were found of 19 tested in an Artificial Insemination (AI) Center. When the same testing procedure was applied to 2386 sera from 10 fattening herds located in four municipalities, antibodies were detected in 61 (2,6%) sera, all derived from three herds with history of AD mortality. It is concluded that ADV infection of breeding herds in the State of Santa Catarina is sporadic in nature, nonendemic, very restricted in distribution and presently under control, due to the surveillance program recently implemented. The finding of infected animals of european origin in an AI center shows us the weakness of our international sanitary police and the dangers involved in the importation of foreign stock. More work is needed to determine the real prevalence and distribution of ADV in fattening herds.

INDEX TERMS: Aujeszky's disease, virus, antibodies, swine, Santa Catarina.

SINOPSE.- Foi realizado um inquérito soro-epidemiológico utilizando-se a prova de imunodifusão (ID) em placa para detectar anticorpos para o vírus da doença de Aujeszky (VDA) em rebanhos suínos no Estado de Santa Catarina. Foram testados 9303 soros, dos quais, 6521 foram obtidos de 67 (89,3%) plantéis de reprodutores dos 75 registrados na Associação Catarinense de Criadores de Suínos, distribuídos por 30 municípios, encontrando-se 64 (1%) soros, pertencentes a seis plantéis, com anticorpos, verificando-se também a ocorrência da doença de Aujeszky (DA) em dois desses seis plantéis. Provas de ID similares realizadas em soros obtidos de 377 caçaços jovens, de cinco das seis Estações de Testes de Reprodutores Suínos existentes em Santa Catarina, distribuídas por cinco municípios, foram todas negativas, enquanto que foram

detectados quatro (21%) reprodutores infectados de 19 testados numa Central de Inseminação Artificial (IA). Quando a mesma prova foi aplicada a 2386 soros de 10 plantéis de terminação, distribuídos por quatro municípios, anticorpos foram detectados em 61 (2,6%) soros, todos obtidos de três plantéis com histórico de mortalidade devida à DA. Concluiu-se que a infecção de plantéis reprodutores com a VDA naquele Estado é esporádica, não endêmica, muito restrita em distribuição e atualmente sob controle, devido ao programa de vigilância recentemente implantado. O achado de reprodutores infectados de origem europeia numa Central de IA demonstra a fraqueza de nosso policiamento sanitário internacional e os perigos de importações de material genético para fins de melhoramento. Mais pesquisa é necessária para determinar a real prevalência e distribuição do VDA em plantéis de terminação.

¹ Aceito para publicação em 26 de junho de 1984.

² Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Embrapa, Caixa Postal D-3, Concórdia, Santa Catarina 89700.

³ Associação Catarinense de Criadores de Suínos, Concórdia, SC.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doença de Aujeszky, vírus, anticorpos, suínos, Santa Catarina.

INTRODUÇÃO

A doença de Aujeszky (DA) ou pseudo-raiva, é uma enfermidade causada por um vírus herpes que afeta a maioria das espécies de "sangue quente". A infecção é geralmente de curso fatal, com exceção dos suínos adultos, os quais são mais resistentes aos efeitos dela do que outros hospedeiros naturais conhecidos (Gustafson 1981).

A infecção com o vírus da DA (VDA) é, primariamente, uma infecção dos suínos, os quais são considerados o principal reservatório do vírus e a partir dos quais o VDA se dissemina tanto verticalmente, pela infecção intra-uterina, como horizontalmente, pela inalação ou pela ingestão e posterior replicação primária na nasofaringe e tonsilas (Gustafson 1981).

Freqüentemente, a infecção é persistente, tornando-se crônica com a liberação intermitente de vírus, ou latente, caso em que o VDA somente pode ser isolado por técnicas não convencionais, tais como a de hibridização de RNA-DNA (Gutekunst 1979).

Várias amostras do VDA isoladas de diversas partes do mundo parecem ser antigenicamente idênticas, porém, a severidade dos surtos da DA dependem da virulência do vírus, da dose infectante, da via de entrada do vírus e da idade dos suínos (Gustafson 1981).

A infecção tem distribuição ampla nos principais países produtores de suínos, tanto no continente europeu quanto na América do Norte (Gustafson 1981). No Brasil, a DA foi descrita pela primeira vez por Carini & Maciel (1912), e desde então, surtos esporádicos têm sido descritos nos Estados de Minas Gerais (Hipólito et al. 1960/61, Silva & Gióvine 1961), Rio de Janeiro (Silva & Döbereiner 1960), Rio Grande do Sul (Bauer 1955) e São Paulo (Carneiro 1950).

Apesar das perdas econômicas consideráveis, decorrentes da alta mortalidade em leitões com menos de duas semanas de idade (Rowe & Romero 1984), não se conhece ainda a distribuição geográfica e a prevalência da infecção com o VDA nos principais estados produtores de suínos da Federação.

No presente trabalho, descrevemos a distribuição e prevalência da infecção em rebanhos suínos do Estado de Santa Catarina, através da presença de anticorpos precipitantes no soro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem de soros

Os soros suínos foram obtidos, na sua maioria, através da Associação Catarinense de Criadores de Suínos (ACCS), Concórdia, Santa Catarina, e correspondiam a (89,3%) plantéis de reprodutores entre os 75 registrados na ACCS, a 10 plantéis de terminação, a cinco das seis Estações de Testes de Reprodutores Suínos (ETRS) existentes, e a uma Central de Inseminação Artificial (IA), todos localizados no Estado de Santa Catarina.

Soros de referência

Inicialmente, os soros de referência utilizados no teste de ID eram originários de suínos com anticorpos neutralizantes e precipitantes para o VDA e obtidos do "National Animal Disease Center", Ames, Iowa, USA. Após, estes soros foram substituídos por outros, com similares características, obtidos de plantéis infectados do Estado de Santa Catarina. Estes soros apresentaram títulos neutralizantes para 200

TCID₅₀ do VDA, superiores a 1:128, no teste de soro microneutralização (SN) em placa (Hill et al. 1977) e, no teste de ID, apresentaram uma ou duas linhas de identidade quando confrontados com os antígenos de referência.

Antígeno de referência

Para preparar o antígeno de referência, foram utilizadas amostras do VDA isoladas de rebanhos suínos do Estado de Santa Catarina (Rowe & Romero 1984). Culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) foram preparadas a partir de ovos embrionados com 10 a 12 dias de incubação, utilizando-se a técnica descrita por Solomon (1975). Os ovos eram oriundos de plantel SPF do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Embrapa, Concórdia, SC. O meio de crescimento era uma mistura de partes iguais dos meios Ham's F10 e 199 contendo 3% de soro bovino adicionado de 200 U de penicilina, 15 µg de sulfato de neomicina e de 25 U de micostatina, por ml de meio de crescimento.

As células eram infectadas em suspensão à temperatura ambiente durante uma hora, misturando aproximadamente 2×10^9 FEG contidos em 40 ml de meio de crescimento com 40 ml do estoque viral, contendo aproximadamente $4 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/ml. Garrafas de Roux foram semeadas com 10^8 FEG em um volume final de 60 ml. Três a quatro dias mais tarde, quando o efeito citopatogênico (CPE) era observado em mais de 50% da monocamada, os fluidos eram coletados num recipiente comum e estocados a 8°C. As culturas eram alimentadas novamente com 60 ml de meio de cultura, isento de soro bovino e, entre 24 e 48 horas após, as monocamadas eram suspensas por agitação no próprio meio de cultura, o qual era clarificado por centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos a 5°C. Sem perturbar o sedimento celular, e estes fluidos eram adicionados aos fluidos da primeira coleta e concentrados em tubos de diálise contra polietileno glicol PM 8.000 a 8°C. O material concentrado dentro dos tubos de diálise era novamente suspenso em água destilada para atingir uma concentração 80 vezes superior ao volume original. Este material foi denominado como antígeno de fluidos.

Para preparar o antígeno celular, o sedimento celular era suspenso em volume igual de tampão fosfatado salina (PBS) e após três ciclos de congelamento e descongelamento o mesmo era testado, juntamente com o antígeno de fluidos, na prova de ID, frente ao soro de referência. Somente eram utilizados antígenos que produzissem linhas nítidas de precipitação.

Prova de imunodifusão

A microprova de ID em agarose para o VDA (Gutekunst et al. 1978) foi modificada e realizada em placas de Petri de 60 x 15 mm. O meio semi-sólido, constituído de tampão tris (hydroxymethyl)-aminomethan 0,05 M de pH 7,2-7,4, contendo 0,05% de azida sódica (NaN₃) e 0,75% de ágar Difco purificado, era distribuído em quantidades de 6 ml por placa e, após a solidificação, as placas eram armazenadas a 8°C entre 24 e 48 horas antes de serem utilizadas. O padrão do teste era hexagonal e constava de um orifício central e seis periféricos, cada um medindo 7 mm de diâmetro, equidistantes entre si (3 mm entre dois consecutivos). O soro de referência positivo era distribuído nos orifícios superior e inferior enquanto que o orifício central era preenchido com o antígeno de referência. Os quatro orifícios periféricos restantes eram preenchidos com os soros em teste. As placas eram mantidas à temperatura ambiente, observadas a cada 24 horas e a leitura final realizada após 72 horas. O teste era considerado válido quando uma ou duas linhas de precipitação apareciam entre o antígeno de referência e cada um dos orifícios contendo o soro de referência. Os soros em teste eram considerados positivos, quando formavam uma ou duas linhas de precipitação, idênticas àquelas formadas pelo soro de referência.

RESULTADOS

O teste de ID foi utilizado para detectar anticorpos para o VDA em 9303 soros suínos. Destes soros, 6521 pertenciam a 67 plantéis de reprodutores registrados na ACCS, distribuí-

dos por 30 municípios. Detectaram-se anticorpos precipitantes em 64 suínos, pertencentes apenas a seis plantéis. Entre estes, constatou-se a DA clínica em dois plantéis (Quadro 1).

Quadro 1. *Anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky no soro de suínos de plantéis reprodutores no Estado de Santa Catarina*

Município	Número de plantéis			Número de suínos	
	Testados	Infectados	Com mortalidade	Testados	Infectados
Águas de Chapecó	1	0	0	74	0
Anchieta	1	0	0	21	0
Braço do Norte	1	0	0	71	0
Caibi	1	0	0	35	0
Campos Novos	1	0	0	37	0
Capinzal	1	0	0	48	0
Chapecó	11	2	1	1646	19
Concórdia	22	2	0	1311	5
Coronel Freitas	1	0	0	54	0
Descanso	1	0	0	56	0
Guaraciaba	1	0	0	43	0
Guarujá do Sul	1	0	0	51	0
Ipumirim	1	1	1	63	36
Itapiranga	1	0	0	63	0
Jaborá	3	0	0	77	0
Jaraguá do Sul	1	0	0	55	0
Lacerdópolis	1	0	0	59	0
Maravilha	1	0	0	37	0
Mondaí	1	0	0	92	0
Pinhaizinho	1	0	0	70	0
São Carlos	1	0	0	34	0
São José do Cedro	1	0	0	95	0
São Lourenço do Oeste	1	0	0	130	0
São Miguel do Oeste	2	0	0	265	0
Usussanga	2	0	0	448	0
Três Barras	2	0	0	516	0
Videira	1	0	0	35	0
Xanxerê	2	1	0	95	4
Xavantina	1	0	0	126	0
Xaxim	1	0	0	814	0
Total	67	6	2	6521	64

Foram similarmente testados 377 soros de machos pertencentes a 11 lotes em teste de desempenho em cinco ETRS e 19 soros de reprodutores de uma Central de Inseminação Artificial (IA), oriundos de cinco municípios. Somente foi detectada a infecção pelo VDA em quatro reprodutores da Central de IA (Quadro 2).

Quando o teste foi realizado em 2386 soros oriundos de 10 plantéis de terminação, distribuídos por quatro municípios, verificou-se a presença de infecção em 61 suínos pertencentes a três dos plantéis, constatando-se também nestes últimos, mortalidade devida à DA (Quadro 3).

Quadro 2. *Anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky no soro de suínos de Estações de Testes de Reprodutores Suínos e Central de Inseminação Artificial no Estado de Santa Catarina*

Município	Número de plantéis			Número de suínos	
	Testados	Infectados	C/ mortalidade	Testados	Infectados
Chapecó	1	0	0	50	0
Concórdia	6	0	0	234	0
Concórdia	1 ¹	1	0	19	4
São Miguel do Oeste	1	0	0	32	0
Videira	1	0	0	6	0
Xanxerê	2	0	0	55	0
Total	12	1	0	396	4

Quadro 3. *Anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky no soro de suínos de plantéis de terminação no Estado de Santa Catarina*

Município	Número de plantéis			Número de suínos	
	Testados	Infectados	Com mortalidade	Testados	Infectados
Faxinal dos Guedes	5	2	2	670	5
Saudades	1	0	0	7	0
Videira	3	0	0	116	0
Xanxerê	1	1	1	593	56
Total	10	3	3	2386	61

DISCUSSÃO

A prova de ID, como descrita no presente trabalho, permitiu a identificação de rebanhos suínos infectados com o VDA. Esta identificação foi possível tanto em plantéis que experimentaram surtos da DA, bem como naqueles sem histórico de sintomatologia clínica da DA.

No Município de Chapecó, das duas granjas de reprodutores identificadas como infectadas, uma apresentava alta mortalidade em leitões com sintomatologia nervosa. Como a granja foi proibida de comercializar reprodutores, o proprietário decidiu eliminar o rebanho com o extermínio do foco de infecção. No segundo plantel, sem sinais de animais doentes, iniciou-se um programa de controle baseado na identificação e remoção dos animais com anticorpos, tanto pela prova de ID como pela de SN conseguindo-se assim a erradicação da infecção (resultados não publicados).

No município de Concórdia, foram identificadas duas granjas de reprodutores infectadas sem histórico de DA, das quais também se erradicou a infecção através da identificação e remoção dos suínos com anticorpos (resultados não publicados).

No Município de Ipumirim, foi detectada uma granja com mortalidade associada à DA, com isolamento viral (Rowe & Romero 1984) e com mais de 50% dos reprodutores infectados. Os reprodutores com anticorpos inicialmente identificados foram abatidos mas não se conseguiu iniciar um programa de erradicação por falta de interesse do proprietário e de le-

gislação apropriada que obrigasse a instituição de tal programa. A granja foi declarada não apta para venda de reprodutores e desde então somente comercializa suínos de terminação para o abate. Acredita-se que, neste tipo de propriedade, a infecção com o VDA poderia tornar-se crônica, causando perdas econômicas pouco aparentes dentro do plantel, mas constituindo-se num sério perigo de disseminação da doença a outros plantéis e áreas não infectadas.

No Município de Xanxerê, foi detectada a infecção numa granja de reprodutores sem histórico de DA. Nessa granja, iníços reprodutores jovens oriundos de diversos plantéis foram ciou-se também um programa de erradicação, que se encontra em andamento.

Soros suínos provenientes de cinco das seis ETRS existentes no Estado, nas quais rotineiramente convergem cachatodos negativos para anticorpos do VDA. Este achado parece indicar que a infecção por este vírus é relativamente rara em plantéis reprodutores do Estado de Santa Catarina. Constatou-se a infecção numa Central de IA na qual os quatro animais detectados como infectados tinham sido importados da Holanda nos últimos dois anos. Estes animais foram abatidos e, após o teste e verificação de negatividade dos 15 reprodutores restantes, a Central foi considerada livre da infecção (resultados não publicados).

Este achado deve alertar-nos dos perigos de importação de suínos de países onde a infecção é endêmica e controlada somente através da vacinação, como é o caso da Holanda (Akkermans et al. 1981), Alemanha (Wittmann et al. 1983), Bélgica (Andries et al. 1981), França (Toma et al. 1983), Irlanda do Norte (McFerran et al. 1979) e dos Estados Unidos da América do Norte (Wright et al. 1982).

Os achados sorológicos em plantéis de terminação são mais difíceis de interpretar em termos de representatividade devido ao pequeno número de plantéis examinados. Suínos sorologicamente positivos somente foram detectados em três plantéis onde estavam em início surtos da DA. O número de suínos com anticorpos era pequeno, indicando recente introdução do VDA nesses plantéis. As perspectivas de controle da DA nos plantéis de terminação não são boas, desde que não foi ainda implantado um sistema de testagem contínuo para detectar suínos infectados com o VDA, como já é o caso dos plantéis reprodutores.

A prova de ID para o VDA foi altamente específica pois, uma reação era considerada positiva somente quando linhas de identidade de precipitação eram observadas entre o soro em teste e o soro de referência positivo. Corroborando as recomendações de Gutekunst et al. (1978), para a microprova de ID, não devem ser utilizados soros de referência de suínos hiperimunes ou todo tipo de soros que forneçam várias linhas de precipitação, pois essas linhas dificultam a interpretação das reações. Porém, a microprova de ID é menos sensível que as provas de SN (Gutekunst et al. 1978; Johnson et al. 1983; Banks & Cartwright 1983) e o teste de ELISA (Banks & Cartwright 1983). Apesar de termos utilizado a prova de ID em placa, que utiliza maior quantidade de reagentes, resultados preliminares não publicados pelos autores também indicam maior sensibilidade da prova de SN. Estes fatos indicam que a

prova de ID pode ser utilizada para detectar rebanhos infectados, devendo-se recorrer ao teste de SN quando se deseja identificar todos os suínos infectados de plantéis em esquemas de erradicação.

O resultado do inquérito sorológico realizado em plantéis de reprodutores suínos do Estado de Santa Catarina indica que a infecção pelo VDA é de caráter epidêmico e não endêmico, de distribuição muito restrita e aparentemente sob controle, a julgar pela ausência atual de rebanhos soro positivos e de rebanhos com sintomatologia clínica associada à DA. A situação em plantéis de terminação merece um estudo mais profundo tanto a nível de abatedouro como de granja para definir a prevalência da VDA.

Agradecimentos.- Agradecemos a valiosa assistência laboratorial de Auria Knaack Dartora e Ivane Müller.

REFERÊNCIAS

- Akkermans J.P.W., Rondhuis P.R. & Wirahadiredja R.M.S. 1981. Ziekte van Aujeszky, p. 36-42, 47-48. In: Stichting voor Diergeneeskunding Onderzoek, Jaarveslag 1978, Lelystad, Netherlands.
- Andries K., Pensaert M. & Vandeputte J. 1981. Virological examination of pigs with acute respiratory disorders. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr.* 50(4): 236-241.
- Banks M. & Cartwright S. 1983. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 113(2): 38-41.
- Bauer A.G. 1955. Primeira constatação do mal de Aujeszky no Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre*, 1: 15-16.
- Carini A. & Maciel J. 1912. La pseudo-rage ou paralísie bulbaire infectieuse au Brésil. *Bull. Soc. Path. Exotique* 5: 576-578.
- Carneiro V. 1950. Distribuição geográfica e frequência da doença de Aujeszky no Brasil. *Biológico, S. Paulo*, 16(3): 49-58.
- Gustafson D.P. 1981. Pseudorabies, p. 209-223. In: Leman A.D., Glock R.D., Mengeling W.L., Penny R.H.C., Scholl E. & Straw B. (eds) *Diseases of swine*. 5th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Gutekunst D.E. 1979. Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1568-1572.
- Gutekunst D.E., Pirtle E.C. & Mengeling W.L. 1978. Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies to pseudorabies virus in swine serum. *Am. J. Vet. Res.* 39: 207-210.
- Hill H.T., Crandell R.A., Kanitz C.L., McAdaragh J.P., Seawright G.L., Solorzano R.F. & Stewart W.C. 1977. Recommended minimum standards for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc. 20th Ann. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnost.* p. 375-390.
- Hipólito O., Silva J.M.L., Batista Junior J.A. & Nascimento Lima S. 1960/61. A doença de Aujeszky em suínos no Estado de Minas Gerais. *Arqs Esc. Sup. Vet., Belo Horizonte*, 13: 61-67.
- Johnson M.E., Thawley D.G., Solorzano R.F. & Wright J.C. 1983. Evaluation of the microimmunodiffusion test for the detection of antibody to pseudorabies virus. *Am. J. Vet. Res.* 44: 28-30.
- McFerran J.B., Dow C. & McCracken R.M. 1979. Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 327-334.

- Rowe C.A. & Romero C.H. 1984. Isolamento e identificação do vírus da doença de Aujeszky de surtos em suínos no Estado de Santa Catarina. *Revta Microbiol., São Paulo.* (Remetido para publicação)
- Silva R.A. & Döbereiner J. 1960. Nota sobre a doença de Aujeszky no Município de Sapucaia, Estado do Rio de Janeiro. *Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 3:* 83-90.
- Silva R.A. & Gióvine N. 1961. Novos focos da doença de Aujeszky no Estado de Minas Gerais. I. Estudo do foco no Município de Almenara. *Arqs Inst. Biol. Animal, Rio de J., 4:* 99-104.
- Solomon J.J. 1975. Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Assoc. Man. 1:* 7-11.
- Toma B., Lorant J.M., Ursache R., Vigouroux A., David C., Bijlenga G., Rose R., Duee J.P., Alamagny A., Laurent J., Goyon M. & Le Gardinier J.C. 1983. La maladie d'Aujeszky en France en 1982. *Recl Méd. Vét. 159(5):* 493-498.
- Wittmann G., Ohlinger V. & Rziha H.J. 1983. Occurrence and reactivation of latent Aujeszky's disease virus following challenge in previously vaccinated pigs. *Arch. Virol. 75:* 29-41.
- Wright J.C., Thawley D.G. & Solorzano R.F. 1982. Field evaluation of test-and-removal and vaccination as control measures for pseudorabies in Missouri Swine. *Can. J. Comp. Med. 46:* 420-425.