

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA DOENÇA DE AUJESZKY DE SURTOS EM SUÍNOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA¹

CHERYL ANN ROWE² e CARLOS H. ROMERO²

ABSTRACT.- Rowe C.A. & Romero C.H. 1986. [Isolation and identification of Aujeszky's disease virus from outbreaks in swine in the State of Santa Catarina.] Isolamento e identificação do vírus da doença de Aujeszky de surtos em suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 6(3):99-103. Centro Nac. Pesq. Suínos e Aves, Embrapa, Cx. Postal D-3, Concórdia, SC 89700, Brazil.

From April 1983, through December 1985, 18 isolations of Aujeszky's disease virus (ADV) were made in the State of Santa Catarina, Brazil, from the brains of piglets (17 samples) and a dog, all of which had shown nervous symptoms. All viruses were isolated either in primary cultures of chicken embryo fibroblasts or in a swine kidney cell line. Identification of the isolated agents was made both by direct immunofluorescence (IF) on coverslips and by virus neutralization (VN) in microplates, using reference serum specific for ADV. All 18 isolates induced a cytopathic effect (CPE) typical of herpesvirus, first noticeable 24 hours after inoculation and characterized by the rounding up and high refractiveness of affected cells. Direct IF demonstrated intense fluorescence of the entire cell monolayer in cultures inoculated with 10% and 1% brain suspensions, while 0.1% suspensions allowed the formation and visualization of bright fluorescent plaques amidst dark areas of uninfected cells. The presence of ADV was also confirmed in the VN test using the third passage of each of the 18 isolates. Characteristic herpesvirus CPE was observed in cultures inoculated with mixtures of the isolates and negative reference serum, while no CPE was seen in cultures inoculated with mixtures of the isolates and positive reference serum. Extracts prepared from the cell fraction and from the fluids of infected cultures contained two antigens that were demonstrable in the immunodiffusion test. Similar extracts prepared from uninfected cultures did not contain these antigens.

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

SINOPSE.- De abril de 1983 a dezembro de 1985, 18 amostras do vírus da doença de Aujeszky (VDA) foram isoladas do cérebro de leitões (17 amostras) e de um cão que apresentavam sintomatologia nervosa. Os vírus foram isolados em culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha ou em uma linhagem celular contínua derivada de rim de suíno. A identificação dos agentes isolados foi realizada utilizando-se os testes de imunofluorescência (IF) direta em lamínulas e de vírus neutralização (VN) em microplacas com soros de referência específicos para o VDA. As 18 amostras induziram efeito citopático típico de vírus herpes observado a partir de 24 horas após a inoculação e caracterizado pelo arredondamento e alta refratividade das células afetadas. O teste de IF direta, mostrou fluorescência intensa das monocamadas inoculadas com suspensões cerebrais de 10% e 1%, enquanto que, as suspensões a 0,1% permitiram a formação e visualização de placas fluorescentes rodeadas de áreas opacas de células não infectadas. A presença do VDA foi também confirmada no teste VN realizado com a ter-

ceira passagem das 18 amostras isoladas. Efeito citopático característico de vírus herpes foi observado nas culturas inoculadas com mistura das amostras virais e soro de referência negativo, enquanto que, as culturas inoculadas com mistura das mesmas amostras virais e soro de referência positivo não desenvolveram efeito citopático. Extratos preparados tanto da fração celular como dos fluídos das culturas infectadas continham dois antígenos, os quais foram evidenciados no teste de imunodifusão. Extratos preparados de culturas não infectadas não continham esses antígenos.

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

INTRODUÇÃO

A doença de Aujeszky (DA) ou Pseudorraiva, é uma enfermidade infecto-contagiosa causada por um vírus herpes, o vírus da doença de Aujeszky (VDA), que afeta a maioria dos animais domésticos e cujo hospedeiro natural é o suíno. Tanto a infecção como a doença tem sido reconhecidos nos cinco continentes, causando perdas econômicas consideráveis, principalmente em suínos e bovinos (Gustafson 1981).

¹ Aceito para publicação em 1 de julho de 1986.

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

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1912 por Carini & Maciel, e, desde então, tem causado infecções fatais esporádicas em alguns estados da Federação (Carneiro 1950, Silva & Döbereiner 1960 e Hipólito et al. 1960/61).

A DA, tem sido diagnosticada em alguns plantéis de suínos no Estado de Santa Catarina, causando 100% de mortalidade em leitões afetados com menos de duas semanas de idade.

No presente trabalho, descrevemos o isolamento e a identificação de 18 amostras do VDA, 17 de leitões e uma de um cão que morreu nas proximidades de uma granja onde estava ocorrendo um surto.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas celulares

Culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha (FEG) foram preparadas segundo a técnica descrita por Solomon (1975). Os ovos eram oriundos do plantel de aves livres de patógenos aviários (Plantel SPF) do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), Embra, Concórdia, SC. A linhagem contínua correspondia a células derivadas de rim de suíno e denominada de SK-6 (Kasza et al. 1972). O meio de crescimento para ambas culturas consistiu de uma mistura em partes iguais dos meios Ham F10 e 199 contendo 4% de soro bovino, penicilina G, potássica cristalina (200 U/ml), sulfato de neomicina (20 µg/ml), sulfato de gentamicina (20 µg/ml), e micostatina (50 U/ml). O meio de manutenção era idêntico mas continha apenas 1% de soro bovino.

Amostras para isolamento viral

Encéfalos de leitões de até duas semanas de idade e de um cão, todos com histórico de distúrbios do sistema nervoso central, foram obtidos entre os meses de abril de 1983 e dezembro de 1985, de plantéis suínos onde estavam ocorrendo surtos de doença infecciosa aguda. Os plantéis estavam localizados nos municípios de Faxinal dos Guedes, Ipumirim, Itapiranga, Seára, Xanxerê e Xavantina no Estado de Santa Catarina.

Preparação dos inóculos

Porções de encéfalo correspondentes ao bulbo olfatório, a ponte cerebelar e a medula oblonga foram esmagadas em triturador de Ten-Broeck, em nove partes (volume : volume) de salina tamponada com fosfatos (PBS) para se obter suspensões a 10%, e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante colhido foram adicionadas 1000 U de penicilina G potássica cristalina, 20 µg de sulfato de neomicina, 20 µg de sulfato de gentamicina e 50 U de micostatina por mililitro. A partir destas suspensões, foram preparadas suspensões a 1 e 0,1% em meio de cultura Ham F10 - 199.

Isolamento viral

Culturas celulares em lamínulas dentro de tubos de Leighton ou em garrafas de vidro ou plástico foram drenados do meio de crescimento e inoculadas com as três concentrações (10, 1 e 0,1%) das suspensões cerebrais. Após período de adsorção de duas horas, as monocamadas eram levadas com PBS, alimentadas com meio de manutenção e observadas diariamente até um máximo de uma semana para observação de efeito citopático característico de vírus herpes. Quando esse efeito era evidente, as lamínulas eram retiradas dos tubos de Leighton, lavadas em PBS, fixadas em acetona fria durante cinco minutos e a seguir submetidas ao teste de IF direta.

Soros de referência

Os soros de referência positivos e negativos utilizados na identificação dos vírus nos testes de imunofluorescência (IF) direta e vírus neutralização (VN) e de antígenos no teste de imunodifusão (ID) corres-

pondiam a soros suínos e foram obtidos do National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA.

Imunofluorescência

Foi utilizado o teste de IF direta (Stewart et al. 1967) empregando-se FEG ou SK-6 como células indicadoras e uma diluição adequada de soro de referência positivo (1:30) marcado com isotiocianato de fluoresceína.

Vírus neutralização

Fluídos de culturas de FEG ou SK-6, infectados com VDA foram propagados mais duas vezes quando as monocamadas apresentavam mais do que 50% de efeito citopático. Os fluídos da terceira passagem foram colhidos, clarificados por centrifugação e testados em triplicata, sem diluir e nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} em presença de soro positivo e negativo para anticorpos neutralizantes no teste de VN em microplacas (Hill et al. 1977).

Extração de antígenos de culturas infectadas

A terceira passagem de cada vírus isolado foi propagada em FEG cultivados em frascos de Roux e, após 24 horas, o meio de crescimento era substituído por meio de manutenção. Quando o efeito citopático era confluyente, o que acontecia geralmente entre 72 e 96 horas após a infecção, as monocamadas eram suspensas por agitação no próprio meio de cultura, o qual era clarificado por centrifugação a 2500 rpm durante 10 minutos e, a seguir, concentrado, em tubos de diálise, por imersão em polietileno glicol PM 8000. O material sólido resultante do processo de concentração era suspenso em água destilada para atingir uma concentração final de 80 vezes o volume original. O sedimento celular era suspenso em volume igual de PBS e depois de três ciclos de congelamento e descongelamento era testado paralelamente com o material preparado dos meios de cultura no teste de imunodifusão (ID). Antígenos foram também preparados dos fluídos sobrenadantes e dos sedimentos celulares de culturas de FEG não infectadas.

Teste de imunodifusão

O microteste de ID dupla em agarose previamente descrito por Gutekunst et al. (1978) foi modificado e adaptado a placas de Petri de 60 x 15 mm. O tampão utilizado correspondia a Tris (Hydroxymethyl) - aminomethan 0,05 M em pH 7,2 - 7,4, contendo 0,05% de azida sódica (NaN_3) e 0,75% de agar Difco purificado. Seis ml da suspensão de ágar foram colocados em placas de Petri e armazenados na geladeira por um período de 24 a 48 horas antes de serem utilizados. O padrão de teste era hexagonal e consistia 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 colocado no orifício central e os antígenos a serem testados nos orifícios periféricos. As placas eram incubadas à temperatura ambiente e a leitura final realizada após 72 horas.

RESULTADOS

Dezessete agentes citopatogênicos foram isolados em cultivos celulares inoculados com suspensões de encéfalo de leitões que apresentaram sintomas nervosos compatíveis com a DA (Quadro 1). Um outro agente citopatogênico foi isolado do encéfalo de um cão morto com sintomas nervosos.

Em isolamento primário, o efeito citopático iniciou-se a partir das 24 horas após a inoculação e caracterizou-se pelo arredondamento e alta refratividade das células afetadas. Essa característica era típica nas culturas inoculadas com suspensões de encéfalo a 10% e 1%, geralmente apresentando entre as 48 e 72 horas, efeito citopático confluyente que se estendia por toda a monocamada, enquanto que, as culturas inoculadas com as

Quadro 1. Amostras do vírus da doença de Aujeszky isoladas de suínos no Estado de Santa Catarina de 1983 a 1985

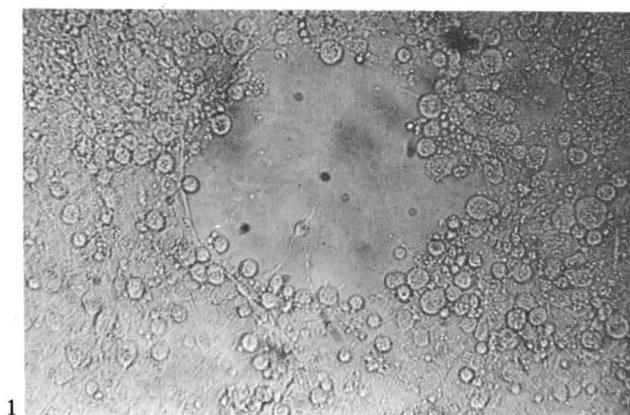
Amostra	Localidade	Granja produtora de
227/83	Ipumirim	Reprodutores
261/83	Ipumirim	Reprodutores
268/83	Ipumirim	Reprodutores
314/83	Xanxerê	Reprodutores
407/83	Xavantina	Terminados
447/83(a)	Seára	Terminados
467/83	Xanxerê	Terminados
585/83	Xanxerê	Reprodutores
607/83	Faxinal dos Guedes	Terminados
659/83	Faxinal dos Guedes	Terminados
715/83	Xavantina	Terminados
843/83	Faxinal dos Guedes	Terminados
100/84	Xanxerê	Terminados
706/84	Itapiranga	Terminados
879/84	Ipumirim	Terminados
1043/84	Itapiranga	Terminados
1044/84	Xanxerê	Terminados
81/85	Xanxerê	Terminados

(a) Amostra isolada do encéfalo de cão nas imediações de granjas de terminação.

suspensões a 0,1% apresentaram efeito citopático característico de vírus herpes, isto é, aparecimento de focos ou placas isoladas (Fig. 1). As culturas não inoculadas não apresentaram efeito citopático (Fig. 2).

O teste de IF direta permitiu a identificação dos 18 agentes citopatogênicos isolados como VDA. As culturas celulares inoculadas com as suspensões de encéfalo a 10 e 1% apresentaram fluorescência generalizada, enquanto que, aquelas inoculadas com as suspensões a 0,1%, apresentaram fluorescência intensa, apenas nas áreas correspondentes a presença de placas (Fig. 3), permanecendo as células não infectadas ao redor das placas, totalmente opacas. As células que compunham estas placas possuíam uma fluorescência intensa a nível de membrana celular, observando-se ocasionalmente, grânulos fluorescentes de localização intra citoplasmática. As culturas celulares não infectadas não apresentaram fluorescência específica e eram uniformemente opacas.

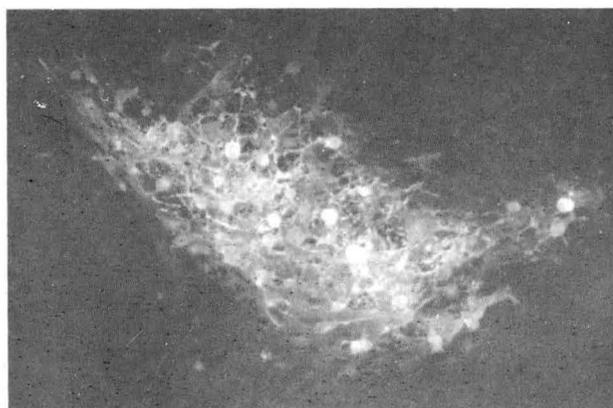
Os resultados observados com o teste de IF foram confirmados com o teste de VN. As três diluições dos 18 vírus isolados foram neutralizados em presença de soro de referência positivo, enquanto que, as três diluições dos mesmos não o foram em presença de soros de referência negativo, observando-se



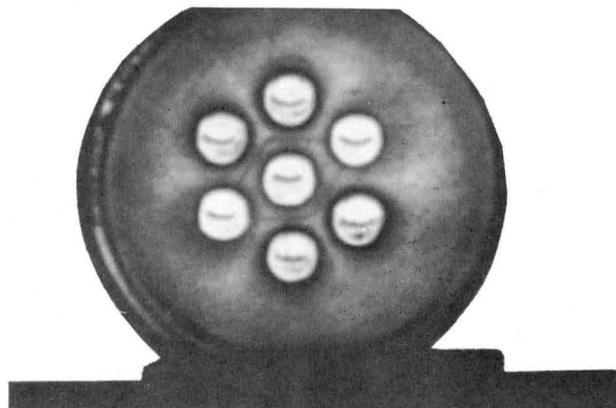
1



2



3



4

Fig. 1. Fibroblastos de embrião de galinha inoculados com a amostra 467/83 do vírus da doença de Aujeszky, mostrando placa característica de vírus herpes. Obj. 20.

Fig. 3. Fibroblastos de embrião de galinha inoculados com a amostra 227/83 do vírus da doença de Aujeszky, mostrando ao teste de fluorescência direta uma placa fortemente corada. Obj. 20.

Fig. 2. Fibroblastos de embrião de galinha não infectados. Obj. 20.

Fig. 4. Teste de imunodifusão em gel de ágar para detectar antígenos do vírus da doença de Aujeszky. Soro de referência positivo (poço central). Antígenos de culturas celulares não infectadas (poços lateral esquerdo superior e lateral direito inferior). Antígenos de culturas celulares infectadas (poços centrais superior e inferior, poço lateral superior direito e lateral inferior esquerdo).

neste último caso, efeito citopático característico de vírus herpes.

O teste de ID em gel de ágar permitiu a demonstração de dois antígenos virais, os quais foram extraídos tanto dos fluídos como das monocamadas das culturas infectadas. Estes antígenos reagiram com o soro de referência positivo formando duas linhas de precipitação (Fig. 4). Preparações similares obtidas de culturas não infectadas foram negativas.

DISCUSSÃO

Foram isoladas 17 amostras do VDA do encéfalo de leitões com histórico de sintomas nervosos e uma amostra do encéfalo de um cão com a mesma sintomatologia. A metodologia utilizada para o isolamento e a identificação das 18 amostras permitiu um diagnóstico seguro, definitivo e relativamente rápido da ocorrência da DA nas propriedades atingidas.

A técnica de IF direta realizada em lamínulas permitiu a identificação das amostras isoladas como sendo o VDA. A utilização de diluições decimais das suspensões de encéfalo facilitou a melhor interpretação dos resultados. As lamínulas inoculadas com a suspensão a 0,1% apresentaram áreas localizadas de fluorescência intensa as quais correspondiam à presença de placas, que adquiriram maior nitidez pelo fato de estarem rodeadas de células não infectadas de aparência normal e sem fluorescência.

Os testes de VN em microplacas, como realizados no presente estudo, evidenciaram o isolamento e a identificação das 18 amostras do VDA em presença de soro de referência sem anticorpos para o VDA, demonstrado pelo aparecimento de efeito citopático característico de vírus herpes. Por outro lado, em presença de soro de referência com anticorpos específicos, o efeito citopático foi completamente inibido nas diluições testadas. Apesar de não termos determinado o número de doses infectantes médias presentes em cada diluição testada, pareceria aconselhável a utilização de soro de referência com título neutralizante relativamente elevado. Estudos recentes realizados pelos autores no Laboratório de Virologia do CNPSA (resultados não publicados) indicaram que o teste de VN pode ser realizado diretamente com suspensões de encéfalo em várias diluições, podendo-se obter títulos superiores a 10^4 doses infectantes médias/g, das áreas do sistema nervoso central descritas em material e métodos. Este procedimento permite o isolamento e a identificação do VDA e fornece um diagnóstico inequívoco e definitivo em um máximo de três dias. Recentemente, foi descrito um teste de IF em impressões de faringe e cérebro para o diagnóstico rápido da DA (Allan et al. 1984), de ótima correlação com o isolamento viral. Segundo esses autores, em presença de anticorpos neutralizantes, o isolamento do VDA de faringe pode ser negativo, enquanto que em impressões da mesma, a IF pode ser positiva. No presente trabalho, as amostras do VDA isoladas originaram-se do encéfalo de animais com sintomatologia nervosa. Não se tentou, em nenhuma oportunidade, o isolamento da faringe.

Os resultados dos testes de ID com extratos de sobrenadantes e de monocamadas de culturas infectadas com as amostras isoladas demonstraram a presença de dois antígenos virais, os

quais apresentaram linhas de precipitação com identidade quando confrontados com soro de referência positivo. A negatividade dos extratos obtidos tanto dos sobrenadantes como das monocamadas de culturas similares não infectadas com o VDA, evidenciou a especificidade dos resultados.

A literatura científica publicada sobre surtos da DA no Brasil, indica que o VDA foi isolado pela última vez em 1966 do sangue periférico de um bovino com sintomas clínicos da doença (Silva & Gióvine 1966). Isolamentos prévios também realizados em coelhos e cobaias evidenciaram a presença do VDA tanto em suínos (Carneiro & Cardin 1947, Hipólito et al. 1960/61) como em bovinos (Silva & Gióvine 1961). Porém, somente em um caso foi o isolamento confirmado sorologicamente (Hipólito et al. 1960/61), através do teste de VN em cobaias.

O isolamento e a identificação das 18 amostras do VDA nos seis municípios do Estado de Santa Catarina não indica necessariamente que a infecção é de natureza endêmica uma vez que a vigilância sorológica dos plantéis de reprodutores e de terminadores suínos tem demonstrado que a frequência de ocorrência de anticorpos para o VDA no rebanho suíno do Estado é muito baixa (Romero et al. 1984, Romero et al. 1986). Como os testes de IF e VN não permitem a diferenciação de amostras do VDA, não é possível, por enquanto, afirmar se os vírus isolados correspondem a surtos epizootologicamente relacionados ou não. Com o desenvolvimento de técnicas para a análise do DNA do VDA utilizando-se endonucleases de restrição, se tornará possível rastrear epizootologicamente a ocorrência de surtos da DA (Pritchett et al. 1984).

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

REFERÊNCIAS

- Allan G.M., McNulty M.S., McCracken R.M. & McFerran J.B. 1984. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by immunofluorescence. *Res. Vet. Sci.* 36: 235-239.
- Carini A. & Maciel J. 1912. La pseudo-rage ou paralysie 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.
- Carneiro V. & Cardim W.H. 1947. A doença de Aujeszky em suínos no Brasil. *Arqs Inst. Biol.*, S. Paulo, 18: 243-252.
- Gustafson D.P. 1981. Pseudorabies, p. 109-223. 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., 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., Grandell 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.
- Kasza L., Shaddock J.A. & Christophinis G.J. 1972. Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. *Res. Vet. Sci.* 13: 46-51.

- Pritchett R.F., Bush C.E., Chang T.J., Wang J.T. & Zee Y.C. 1984. Comparison of the genomes of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus strains by restriction endonuclease analysis. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2486-2489.
- Romero C.H., Rowe C.A., Provenzano G.I., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1984. Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para vírus da doença de Aujeszky em plantéis suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 4(4): 123-127.
- Romero C.H., Marques J.L., Rowe C.A., Flores R.M.S. & Brentano L. 1986. A situação da doença de Aujeszky no Estado de Santa Catarina em 1984. *Pesq. Agrop. Bras.* (No prelo)
- 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.
- Silva R.A. & Gióvine N. 1966. Novos focos da doença de Aujeszky no Estado de Minas Gerais. III – A passagem do vírus de Aujeszky pelo sangue na doença natural em bovino. *Pesq. Agropec. Bras.* 1: 71-72.
- Solomon J.J. 1975. Preparation of avian cell cultures. *Tiss. Cult. Assoc. Man.* 1: 7-11.
- Stewart W.C., Carbrey E.A. & Kresse J.I. 1967. Detection of pseudorabies virus by immunofluorescence. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 151: 747-751.