

Soroneutralização como teste sorológico diferencial entre infecções pelo vírus da peste suína clássica e outros pestivírus

(Serum neutralization as a differential serological test for classical swine fever virus and other pestivirus infections)

J.C.M. Paredes¹, E.A.S. Oliveira¹, L.G. Oliveira¹, J.C.A. Rosa¹, P.M. Roehe^{1,2*}

¹Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO)
Centro de Pesquisa Veterinária "Desidério Finamor" (CPVDF)
Estrada do Conde, 6000

92990-000 - Eldorado do Sul, RS

²Centro de Ciências Básicas da Saúde – UFRS

Recebido para publicação em 26 de fevereiro de 1999.

Suporte financeiro: FAPERGS e CNPq

Colaborador: A.C. Braga

*Autor para correspondência

E-mail: proehe@vortex.ufrgs.br

RESUMO

Testes de soroneutralização (SN) foram realizados para detecção de anticorpos contra os vírus da peste suína clássica (VPSC), da diarréia viral bovina (VDVB) e do vírus da doença da fronteira ou "border disease" dos ovinos (VBDO) em amostras de soros suínos coletadas para triagem de anticorpos antiVPSC, com o objetivo de determinar o valor da SN como prova sorológica diferencial. Noventa e nove soros de uma amostragem de 16.664 foram positivos em um teste de ELISA policlonal, incapaz de diferenciar anticorpos induzidos contra os diferentes pestivírus. Quando submetidos à SN, 81 apresentaram anticorpos somente contra o VPSC. Dezesete soros apresentaram anticorpos com reatividade cruzada contra os VPSC, VDVB ou VBDO, e na maioria deles (13/17) as diferenças entre os títulos obtidos pela SN não permitiram inferir qual seria o vírus provável indutor dos anticorpos detectados. Concluiu-se que a prova requer cuidados ao ser usada com essa finalidade, pois quando amostras isoladas de soro são examinadas a variação entre os títulos de anticorpos pode ser insuficiente para permitir essa diferenciação, necessitando uma amostragem que inclua um número significativo de animais dentro do criatório ou da granja suspeita.

Palavras-chave: suíno, peste suína clássica, pestivírus, sorologia

ABSTRACT

Serum neutralization tests (SN) were performed against classical swine fever virus (CSFV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and border disease virus (BDV) on samples of swine serum collected for screening of antibodies to CSFV, in order to determine the SN value as a differential serological test. Ninety-nine sera out of a sample of 16,664 were positive for antibodies to pestiviruses in an ELISA test which did not distinguish antibodies to different pestiviruses. When submitted to SN, 81 sera were positive for CSFV antibodies only. In 17 sera, crossreactive antibodies to either CSFV, BVDV or BDV were detected. In most of these sera (13 out of 17) the differences between SN titres against the three viruses were not sufficient to estimate which was the most likely antibody-inducing virus. It was concluded that, for the SN to be useful in such differentiation, it is essential to examine a sample which must include a representative number of sera from the same farm where suspect animals were detected. When isolated serum samples are examined, such as those obtained with the sampling strategy adopted here, the SN may give rise to inconclusive results.

Keywords: Swine, classical swine fever, pestivirus, serology

INTRODUÇÃO

O vírus da peste suína clássica (VPSC) e o vírus da diarreia viral dos bovinos (VDVB), juntamente com o vírus da doença da fronteira ou "border disease" dos ovinos (VBDO), são membros reconhecidos do gênero *Pestivirus*, família Flaviviridae (Francki et al., 1991). Tanto o VDVB como o VBDO podem infectar suínos (Stewart et al., 1971; Wensvoort et al., 1988; Roehe et al., 1992). Essas infecções, embora possam causar diferentes manifestações clínicas nessa espécie, muitas vezes ocorrem de forma assintomática (Roehe, 1991). Os pestivírus de ruminantes, devido à sua infectividade relativamente limitada em suínos e ao baixo nível de risco que representam para esta espécie, são epidemiologicamente muito menos importantes do que o VPSC. Não obstante, em animais infectados com VDVB ou VBDO, reações cruzadas podem dar margem a equívocos na interpretação de testes sorológicos.

Presentemente, encontra-se em andamento no Brasil o "Programa de Erradicação da Peste Suína Clássica" (MAARA, 1992). Dentro desse programa, os testes que têm sido recomendados para triagem inicial dos soros são ensaios imunoenzimáticos (Wensvoort et al., 1988; Leforban et al., 1990). Os testes de "primeira geração" (Leforban et al., 1990) não são capazes de diferenciar anticorpos antiVPSC daqueles induzidos por outros pestivírus. Já os testes mais elaborados (Wensvoort et al., 1988) são capazes de diferenciar somente anticorpos antiPSC de anticorpos antiVDVB, porém não antiVBDO. Por esses motivos, a prova ainda considerada "gold standard" para a diferenciação entre os três pestivírus é o teste de soroneutralização (SN), no qual o soro suspeito é examinado em sua capacidade de neutralizar os três diferentes pestivírus (VPSC, VDVB e VBDO), com maior ou menor intensidade (Jornal, 1991).

No Brasil, em cumprimento às determinações do Programa de Erradicação da Peste Suína Clássica, os Estados livres de PSC devem proceder ao monitoramento de seus rebanhos por meio de testes sorológicos (MAARA, 1992). No Rio Grande do Sul, Estado declarado livre de PSC, o primeiro monitoramento do perfil sorológico foi feito recentemente, sendo examinadas 16.664 amostras de

soros com a utilização do teste de ELISA de primeira geração, recomendado à época (ELISA-PPC, Sanofi Pasteur Diagnostics).

No presente estudo, foi realizada uma análise da eficácia da prova de SN como teste diferencial entre infecções por VPSC, VDVB e VBDO, quando aplicada sobre uma amostragem em larga escala, amostragem esta que foi feita visando determinar o perfil sorológico da população suína do Estado do Rio Grande do Sul, cerca de dois anos após a proibição da vacinação contra a Peste Suína Clássica no Estado. O objetivo do presente estudo foi avaliar a validade da SN na determinação do pestivírus mais provável indutor dos anticorpos eventualmente encontrados, quando aplicado sobre esse tipo de amostragem.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 16.664 soros de suínos, coletados com base no número de municípios cadastrados junto à Associação de Criadores de Suínos do Estado do Rio Grande do Sul (ACSURS), após uma análise estatística delineada com base em uma expectativa teórica de prevalência da enfermidade em 1% do rebanho, assumindo uma população de suínos, e adotando a fórmula recomendada por Thrusfield (1986). Além disso, a amostragem foi viciada pela inclusão de soros de propriedades com problemas reprodutivos. Pelo método de amostragem adotado, dos 50 criatórios amostrados, 30 contribuíram com somente uma amostra, oito criatórios com duas amostras; quatro com três, dois com quatro e os seis criatórios restantes, com cinco ou mais amostras de acordo com o esquema de amostragem estabelecido (Ishizuka, 1998, comunicação pessoal).

Para a multiplicação do VPSC amostra Alfort 187 (Dahle et al., 1987) foram utilizadas células da linhagem rim de suíno SK6 (Kasza et al., 1972). Para a multiplicação do VDVB amostra Oregon C24V (Gillespie et al., 1961) e do VBDO, amostra de VBDO "BD Weybridge" ou "BDW" (Harkness et al., 1977) foram utilizadas células da linhagem Madin Darby bovine kidney (MDBK). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (E-MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell). O soro utilizado nos cultivos foi previamente testado para assegurar a ausência de pestivírus ou anticorpos antipestivírus. Ao meio foram adicionados 0,2 ml de enrofloxacin (Baytril) a 5% por litro de meio de cultura. As células foram repicadas 1-2 vezes por semana, conforme técnicas usuais (Roehe, 1991).

Os estoques de vírus foram produzidos pela inoculação de suspensões virais a multiplicidades de infecção entre 0,01 e 0,1, em garrafas plásticas de 25cm², seguindo procedimentos usuais (Roehe, 1991), sendo as titulações das suspensões realizadas em microplacas de 96 orifícios e os títulos determinados pelo método de Spearman e Karber (Lorenz & Bögel, 1973).

Foram feitos testes de ELISA com o emprego do kit comercial (ELISA-PSC; Sanofi-Pasteur) recomendado pelo MAARA à época da realização deste estudo (Silva, 1997). Foram testados pelo ELISA todos os 16.664 soros coletados.

Para os testes de soroneutralização contra o VPSC foi utilizada a técnica denominada "neutralizing peroxidase linked assay" ou "NPLA", descrita previamente (Jensen, 1981). Resumidamente, diluições (1:10 a 1:320) dos soros em meio E-MEM foram distribuídos em microplacas de 96 orifícios e incubadas com 100 DICC₅₀ da amostra Alfort 187 de VPSC. Após a incubação, uma suspensão com aproximadamente 3×10⁴ células SK-6 em meio E-MEM foram adicionadas, as placas incubadas a 37°C em atmosfera com 3% de CO₂ por quatro dias e fixadas para imunoperoxidase, como descrito abaixo.

Para a SN visando à detecção de anticorpos contra o VBDO, o procedimento utilizado foi o mesmo descrito acima, porém com 100 doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) da amostra BDW, sobre células MDBK. Igualmente, para os testes de SN contra o VDVB, o procedimento foi o mesmo, sendo utilizadas 100 DICC₅₀ da amostra Oregon C24V, sobre células MDBK. Para estes últimos, como a amostra Oregon C24V é citopatogênica para os cultivos de MDBK, a leitura foi realizada pela verificação da presença ou ausência do efeito citopático característico.

A técnica de imunoperoxidase (IPX) foi realizada como descrito previamente (Saunders,1977; Jensen, 1981).

RESULTADOS

Os testes de ELISA das 16.664 amostras examinadas revelaram 146 (0,87%) amostras positivas. Devido à indisponibilidade de soros em volume suficiente, somente 99 dos 146 soros positivos foram examinados pela SN, contra as amostras dos três distintos pestivírus (VPSC, VDVB e VBDO), e os resultados são apresentados na [Tab. 1](#). Dos 99 soros analisados, 81 foram positivos somente para anticorpos antiVPSC. Sessenta e oito amostras (amostras 18 a 85; [Tab. 1](#)) foram positivas somente contra o VPSC. Dezesete amostras (amostras 1 a 17; [Tab. 1](#)) apresentaram reatividade cruzada com VDVB ou com VBDO. Os títulos de anticorpos neutralizantes detectados na maioria dos soros com reatividade cruzada foram iguais ou muito semelhantes, tanto para VBVD como para VPSC, não apresentando diferenças significativas, isto é, iguais ou superiores a quatro vezes (Herrmann, 1985). Sete das 17 amostras de soro apresentaram anticorpos neutralizantes para o VBDO. Somente em quatro amostras de soro (soros número 3, 6, 13 e 17) foi possível detectar diferenças significativas contra um dos três vírus incluídos nos testes. Em uma delas (amostra número 3) o título de anticorpos antiVBDO foi significativamente mais elevado do que o título dos outros dois pestivírus.

Tabela 1. Comparação entre os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos contra os vírus da diarreia viral bovina (VDVB), peste suína clássica (VPSC) e "border disease" dos ovinos (VBDO)

Amostra de soro	Título de anticorpos neutralizantes anti		
	VDVB	VPSC	VBDO
1	28♣	60♣	@
2	30	30	-
3	30	56	402(#)
4	40	30	-
5	48	113	-
6	50	242(#)	28
7	60	56	124
8	60	124	-
9	113	112	30
10	30	56	30
11	50	100	40
12	56	56	-
13	113(#)	28	-
14	124	124	-
15	160	113	-
16	50	113	-
17	100	402(#)	40
18-85	-	28a >512	-
86-90	-	-	-
91-99	Tóx##	Tóx	Tóx

♣ Expressos como a recíproca do título de anticorpos neutralizantes capazes de neutralizar 50% de 100 DICC₅₀ de VPSC, VDVB e VBDO.

@ Soros considerados negativos para anticorpos neutralizantes (títulos < 1/10)

(#) Soros com títulos considerados significativamente maiores (iguais ou superiores a quatro vezes) contra um dos três vírus testados.

(##) Soros tóxicos para os cultivos celulares.

DISCUSSÃO

A prova de SN é reconhecida como padrão para a avaliação de resultados de provas sorológicas para o diagnóstico de infecções pelo VPSC (Jornal, 1991). Não obstante, sua aplicação como teste diferencial de infecções por outros pestivírus pode ser bastante complicada, particularmente quando são examinadas amostras isoladas, no qual um soro é tomado como representativo do "status" sorológico de uma população. Como demonstrado aqui, os níveis de anticorpos podem não ser suficientes para permitir uma conclusão inequívoca a respeito de qual dos pestivírus foi o responsável pela indução dos anticorpos detectados.

Tradicionalmente, diferenças são consideradas significativas em provas sorológicas quando são iguais ou superiores a quatro vezes (Herrmann, 1985). Nos casos aqui apresentados estas diferenças foram, em sua maioria, inexistentes ou não significativas. Dentre os soros analisados, somente quatro apresentaram títulos de anticorpos iguais ou superiores a quatro vezes nos testes contra os três vírus, o que permitiria estimar qual o provável agente indutor daquela resposta. Não obstante, nos demais soros a diferenciação precisa não poderia ser feita com base nos títulos obtidos, uma vez que não houve diferenças significativas. Portanto, quando o objetivo for a determinação do provável pestivírus causador da infecção, o resultado da SN deve ser interpretado com cautela. Embora geralmente os títulos de anticorpos sejam superiores contra o vírus causador da infecção (Hafez et al., 1976; Stewart et al., 1971; Roehle, 1991), sabe-se que, dentro de uma população, em alguns animais podem-se observar títulos de anticorpos superiores contra um vírus distinto, embora

antigenicamente semelhante (Hafez et al., 1976; Liess et al., 1977; Jensen, 1981; Wensvoort et al., 1988; Roehe, 1991), particularmente no caso dos pestivírus, os quais apresentam notória heterogeneidade antigênica (Moennig, 1990; Harkness & Roeder, 1988). Assim, é fundamental que sejam analisadas várias amostras de soro da mesma granja, amostras estas que sejam realmente representativas do "status" sorológico do grupo de animais sob suspeita. Ao contrário de outros testes mais específicos (Wensvoort et al., 1988; Leforban et al., 1990), a SN pode ser utilizada com essa finalidade quando a amostragem dos soros é feita com um número representativo de animais em um criatório. Quando amostras de soro isoladas são examinadas, como no caso do método de amostragem adotado, ocasionalmente poderão ser detectados resultados inconclusivos. Considerando que o método adotado para essa amostragem deverá ser o mesmo a ser empregado para a sorologia de PSC nos demais Estados do País participantes do Programa de Erradicação da Peste Suína Clássica.

Outra observação interessante foi realizada em uma das amostras de soro, a qual apresentou títulos de anticorpos neutralizantes significativamente superiores contra o VBDO. Evidentemente, esse resultado singular carece de significância, sendo impossível especular a respeito da ocorrência de VBDO na região estudada com somente um dado isolado. Embora essa possibilidade já tenha sido comprovada em outros países (Roehe et al., 1992), no Brasil o VBDO ainda não foi isolado, o que sugere que esse vírus ainda é exótico no País. Não obstante, a possibilidade da ocorrência de infecções pelo VBDO em suínos nos criatórios brasileiros é concreta, o que implica em que os laboratórios estejam preparados para fazer essa diferenciação. Assim, a ocorrência de anticorpos contra o VBDO deve ser contemplada no diagnóstico diferencial de peste suína clássica.

Portanto, para o diagnóstico diferencial preciso e conclusivo de infecções por pestivírus, os testes de SN devem ser realizados contra os três membros reconhecidos do gênero, VPSC, VDVb e VBDO. Além disso, é necessário que as provas sejam realizadas sobre uma amostragem significativa de soros em um determinado criatório, amostragem essa que deve ser realmente representativa do "status" sorológico da população sob análise, não podendo basear-se no exame de amostras isoladas de soro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração e comentários da Profa. Masaio Misuno Ishizuka na análise do presente artigo. Este trabalho foi parcialmente financiado com recursos da FAPERGS e do CNPq. J.C.M. Paredes, durante a execução deste estudo, foi bolsista do CPG em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS. P.M. Roehe é bolsista pesquisador do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAHLE, J., LIESS, B., FREY, H.R. Interspecies transmission of pestiviruses: Experimental infections with bovine viral diarrhoea virus in pigs and hog cholera virus in cattle. In: *Pestivirus Infections of Ruminants*. Commission of the European Communities, publ. EUR 10238, 1987. p.195-211. [[Links](#)]
- FRANCKI, R.I.B., FAUQUET, C.M., KNUDSON, D.L. et al. *Flaviviridae*. *Arch.Virol.* Suppl.2, p.223-233, 1991. [[Links](#)]
- GILLESPIE, J.H., BAKER, J.A., MacENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhoea virus. *Cornell Vet.*, v.50, p.73-79, 1961. [[Links](#)]
- HAFEZ, S.M., LIESS, B., FREY, H.R. Studies on the natural occurrence of neutralizing antibodies against six strains of bovine viral diarrhoea virus in field sera of cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, v.23, p.669-677, 1976. [[Links](#)]
- HARKNESS, J.W., KING, A.A., TERLECKI, S. et al. Border disease virus of sheep: isolation of virus in tissue culture and experimental reproduction of the disease. *Vet. Rec.*, v.100, p.71-72, 1977. [[Links](#)]
- HARKNESS, J.W., ROEDER, P. The comparative biology of Classical Swine Fever. In: B. Liess (ed.), *Classical Swine Fever and Related Viral Infections*. Boston: Martinus Nijhoff, 1988. p.233-288. [[Links](#)]
- HERRMANN, K.L. Viral serology. In: LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER Jr., W.J. et al. (eds.) *Manual of clinical microbiology*, 4.ed., Washington: American Society for Microbiology p.921-923, 1985. [[Links](#)]
- JENSEN, M.H. Detection of antibodies against hog cholera virus and bovine viral diarrhoea virus in porcine serum. A comparative examination using CF, PLA and NPLA assays. *Acta Vet. Scand.*, v.22, p.85-98, 1981. [[Links](#)]
- JOENAL OFICIAL DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Nº L 377/8. Anexo 1. p. 53-59, 31.12.1991. [[Links](#)]
- LEFORBAN, Y., EDWARDS, S., IBATA, G. et al. A blocking ELISA to differentiate hog cholera from virus antibodies from those due to other pestiviruses. *Ann. Rech. Vet.*, v.21, p.119-129, 1990. [[Links](#)]
- LIESS, B., FREY, H.R., PRAGER, D. Antibody response of pigs following experimental infections with strains of hog cholera and bovine viral diarrhoea virus. In: AGRICULTURAL RESEARCH SEMINAR ON HOG CHOLERA/CLASSICAL SWINE FEVER. Commission of the European Communities. Publication EUR 5904, 1977. p.200-213. [[Links](#)]
- LORENZ, R.J., BÖGEL, K. Methods of calculation. In: KAPLAN, M.M., KOPROWSKY, H. (Eds.) *Laboratory techniques in rabies*. Geneva: World Health Organization. 1973. p.329-332. [[Links](#)]

KASZA, L., SHADDUCK, J.A., CHRISTOFINIS, G.J. Establishment, viral susceptibility and biological characteristics of a swine kidney cell line SK-6. *Res. Vet. Sci.*, v. 13, p. 46-51, 1972. [[Links](#)]

MAARA - Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária - Departamento de Defesa Animal. *Manual de Procedimentos*. Programa de Controle e Erradicação da Peste Suína Clássica. Brasília, 61p., 1992. [[Links](#)]

MOENNIG, V. Pestiviruses: a review. *Vet. Microbiol.*, v.23, p.35-54, 1990. [[Links](#)]

ROEHE, P.M. *Studies on the comparative virology of pestiviruses*. Guilford: University of Surrey, 1991. (PhD Thesis). [[Links](#)]

ROEHE, P.M., Woodward, M.J., Edwards, S. Characterisation of p20 gene sequences from a border disease-like pestivirus isolated from pigs. *Vet. Microbiol.*, v.33, p.231-238, 1992. [[Links](#)]

SAUNDERS, G.C. Development and evaluation of an enzyme-labeled antibody test for rapid detection of Hog Cholera antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.21-25, 1977. [[Links](#)]

SILVA, F.J.F. (1997) Ministério da agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Sanitária, Departamento de Defesa Animal. *Ofício circular n.24/CPS*. 13/05/97. Brasília, DF. [[Links](#)]

STEWART, W.C., CARBREY, E.A., JENNEY, E.W. et al. Bovine viral diarrhea infection in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.159, p.1556-1563, 1971. [[Links](#)]

THRUSFIELD, M. *Veterinary epidemiology*. Londres: Butterwoths, 1986. [[Links](#)]

WENSVOORT, G., BIOEMRAAD, M., TERPSTRA, C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies to and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, v.17, p.129-140, 1988. [[Links](#)]

All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License

Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567
30123-970 Belo Horizonte MG - Brazil

Tel.: (55 31) 3409-2041

Tel.: (55 31) 3409-2042

 e-Mail

abmvz.artigo@abmvz.org.br