

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CEPA DE MODERADA VIRULÊNCIA DO VÍRUS DE PESTE SUÍNA CLÁSSICA NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

Mara Eliza Gasino Joineau
Rosária Regina Tesoni Barros Richartz
Maria Aparecida de Carvalho Patrício
Ernesto Renato Krüger
Abdel Naser Haj Ahmad
Metry Bacila

GASINO-JOINEAU¹, M.E.; RICHARTZ², R.R.T.B.; PATRÍCIO³, M.A.C.; KRÜGER⁴, E.R.; AHMAD⁵, A.N.H.; BACILA⁶, M. Isolamento e caracterização de cepa de moderada virulência do vírus de Peste Suína Clássica no Estado do Paraná, Brasil. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(1): p.41 - 48, 2001.

RESUMO: Trata o presente trabalho do isolamento viral realizado em outubro de 1997, no Laboratório de Virologia do Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti”, de uma cepa de moderada virulência do vírus da Peste Suína Clássica (PSC), a partir de fragmentos de órgãos provenientes de granjas de suínos do município de São Pedro do Iguacu, Paraná, Brasil. Foram empregadas técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase indiretas em cortes histológicos, ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígeno viral e isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK15 (Porcine Kidney, *Sus scrofa*). Os resultados positivos obtidos pelas diferentes técnicas empregadas mostraram grande precisão para o diagnóstico da Peste Suína Clássica. Com base nesses resultados, o Serviço de Sanidade Animal recomendou o abate de cerca de 2.000 suínos em sete propriedades envolvidas no foco e a tomada de medidas zoonosológicas adequadas para prevenir a disseminação da doença.

PALAVRAS-CHAVE: peste suína clássica, *Pestivirus*, isolamento viral

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A MODERATE VIRULENCE STRAIN OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS, IN STATE OF PARANÁ, BRAZIL

GASINO-JOINEAU, M.E.; RICHARTZ, R.R.T.B.; PATRÍCIO, M.A.C.; KRÜGER, E.R.; AHMAD, A.N.H.; BACILA, M. Isolation and characterization of a moderate virulence strain of Classical Swine Fever virus, in state of Paraná, Brazil. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(1): p.41 - 48, 2001.

ABSTRACT: The present research refers to the isolation and characterization of a moderate virulence strain of Classical Swine Fever Virus (CSFV), from an outbreak occurred in several farms of São Pedro do Iguacu, Paraná State, Brazil, during the year of 1997. Laboratory methods for diagnose of classical swine fever comprised Indirect Immunofluorescence test (IFT) and Indirect Immunoperoxidase (IPT) on frozen histological sections and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to detect viral antigen. Viral isolation was performed by culture on PK15 cells lineage (Porcine Kidney, *Sus scrofa*). The positive diagnostic results obtained through established methodologies were additive, showing that the Classical Swine Fever (CSF) diagnose was made on solid grounds. Based on these data, the Animal Health Service's veterinarians recommended to stamp out about two thousand pigs in seven farms involved in the outbreak

¹ Médica Veterinária, Mestre, Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” – Rua Jaime Balão, 575. CEP 80040-340 Curitiba, PR. Brasil

² Médica Veterinária, Mestre, Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” – Rua Jaime Balão, 575, Curitiba, PR.

³ Médica Veterinária, Especialista, Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” – Rua Jaime Balão, 575, Curitiba, PR. e-mail: seabcdme@pr.gov.br

⁴ Médico Veterinário, Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti” – Rua Jaime Balão, 575, Curitiba, PR.

⁵ Médico Veterinário, Especialista, Seção de Doenças de Suínos, DDSA, DEFIS, SEAB Curitiba, PR.

⁶ Médico, Professor PUC – PR, Rua Comendador Roseira, Prado Velho – Curitiba-PR

and to take adequate zoosanitary profilatic proceedings to prevent the spread of the disease.

KEY WORDS: classical swine fever, hog cholera, *Pestivirus*, viral isolation

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE MODERADA VIRULENCIA DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA CLASICA EN EL ESTADO DE PARANÁ, BRASIL

GASINO-JOINEAU, M.E.; RICHARTZ, R.R.T.B.; PATRÍCIO, M.A.C.; KRÜGER, E.R.; AHMAD, A.N.H.; BACILA, M. Aislamiento y caracterización de una cepa de moderada virulencia del virus de la Peste Porcina Clasica en el estado de Paraná, Brasil. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 4(1): p.41 - 48, 2001.

RESUMEN : El presente trabajo trata del aislamiento viral realizado en octubre de 1997 en el Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti", de una cepa de moderada virulencia de Peste Porcina Clásica, a partir de animales provenientes de granjas de suínos del municipio de São Pedro do Iguacu, Estado de Paraná. Fueron empleadas las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta en cortes histológicos, y ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detección del antígeno viral, aislamiento viral en cultivo celular del linaje PK 15 (Porcine Kidney, *Sus scrofa*). Los resultados positivos obtenidos de las diferentes técnicas empleadas fueron aditivos, mostrando gran precisión para el diagnóstico de la Peste Porcina Clasica. Con base en estos resultados, los técnicos del Servicio de Salud Animal recomendaron la eliminación de alrededor de 2.000 suínos en siete granjas distintas relacionadas con el foco y tomadas de medidas zoonitarias adecuadas para prevenir la diseminación de la enfermedad.

PALABRAS-CLAVE : peste porcina clasica; *Pestivirus*; aislamiento viral

Introdução

A Peste Suína Clássica (PSC) é uma enfermidade viral contagiosa que acomete somente suídeos. A doença é causada por um vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (WENGLER, 1991).

Existe grande variação entre as cepas virais de PSC. As cepas de alta virulência produzem hemorragias múltiplas e a doença aguda, quando a taxa de mortalidade pode chegar a 100%. Cepas de baixa e moderada virulência determinam o aparecimento das formas atípica, crônica ou subclínica da doença (VAN OIRSCHOT, 1980; TERPSTRA, 1991; OIE, 2000).

O quadro clínico das infecções causadas por cepas de alta e baixa virulências comumente não varia em relação à idade, constituição genética, condição nutricional e resposta imunitária do hospedeiro. No que tange a amostras de moderada virulência, a resposta individual é variável e pode ser caracterizada por morte devida à doença aguda ou subaguda, persistência viral, cronicidade, doença fetal ou recuperação (VAN OIRSCHOT, 1980).

O vírus da PSC é antigênicamente relacionado ao vírus da Diarréia Bovina Viral (BVD) e ao vírus da Border Disease (BD) ou Doença da

Fronteira, dois *Pestivirus* de ruminantes que podem infectar suínos (VAN OIRSCHOT, 1983; TERPSTRA & WENSVOORT, 1988). É necessário o uso de anticorpos monoclonais (Mabs) para o diagnóstico diferencial entre PSC e BVD (WENSVOORT *et al.*, 1986).

Grande importância econômica é atribuída à PSC na suinocultura industrial porque, além de diminuir a produtividade do rebanho nas formas crônicas da doença, e causar alta taxa de mortalidade nas suas formas agudas, representa uma barreira à exportação de carne suína para os países livres ou em fase de erradicação dessa virose.

A primeira notificação dessa virose ocorreu em Ohio, Estados Unidos, em 1830. Hoje, a PSC possui distribuição mundial. Nas últimas décadas, alguns países, por exemplo os Estados Unidos, o Canadá e a Inglaterra, têm tido sucesso na erradicação dessa infecção. Nos países onde a PSC é enzoótica, a doença é de alta importância econômica (VAN OIRSCHOT & TERPSTRA, 1989). No Brasil, a primeira citação da PSC é datada de 1888 por Lacerda (BRASIL, 1980). Porém, por um período relativamente longo não se teve mais registros de sua ocorrência. Em 1931, a doença foi relatada em São Paulo, permanecendo até 1939, sem ocasionar problemas sig-

nificativos (D'APICE, 1945). O Programa Nacional de Controle da Peste Suína Clássica, implantado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA) em 1946, baseou-se na vacinação, controle de trânsito de animais e outras medidas sanitárias (BRASIL, 1980). O Estado do Paraná está em fase final de erradicação da Peste Suína Clássica (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 por meio de amostragens sorológicas, sendo que no período compreendido entre junho de 1993 e agosto de 1997 não foi detectada atividade viral no Estado (PARANÁ, 1993-1997). Após esse período, o primeiro registro de foco foi em outubro de 1997 (PARANÁ, 1997a).

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, problemas respiratórios, manchas avermelhadas na pele (orelhas e ventre), conjuntivite, diarreia, vômito, posição de "cão sentado" e tendência em se agrupar. No segundo foco da doença, uma propriedade produtora de leitões, os maiores problemas foram encontrados nas matrizes, as quais apresentaram febre alta, abortamento no terço final da gestação, e na creche, 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 a eutanásia e a incineração de cerca de 2000 animais e a interdição das propriedades contidas num raio de três km, 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).

Material e Métodos

No Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti" (CDME / SEAB), em outubro de 1997, foi isolado o vírus da PSC a partir de amostras de fragmentos de órgãos de sete animais, enviadas

do município de São Pedro do Iguaçu, localizado na região de Toledo, região Sudoeste do Estado do Paraná, responsável por 40,11% da produção total de suínos do Estado (PARANÁ, 1997a e 1999).

Amostras

Soro sanguíneo e fragmentos de tonsilas, rins, baço, linfonodos, porção distal do íleo e fígado de sete leitões com idade entre dois e três meses, enviados sob refrigeração ao Centro de Diagnóstico "Marcos Enrietti" para exame.

Seguindo as normas padronizadas pelo Office International des Epizooties (OIE, 2000), as técnicas de diagnóstico utilizadas foram a detecção de antígeno viral direta em cortes histológicos, isolamento viral em cultivos celulares (diferencial entre PSC e BVD), ELISA de captura de antígeno para PSC, ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus da PSC e neutralização viral.

Imunofluorescência indireta (IFI)

Para a detecção do vírus da Peste Suína Clássica em cortes histológicos por imunofluorescência indireta (IFI), todos os fragmentos de órgãos foram processados em micrótomo de congelamento (Leitz-Áustria). Os cortes histológicos preparados foram fixados em acetona P.A. e então cobertos com anticorpo monoclonal anti-vírus da PSC, produzido em camundongo. Após incubação, em estufa 37°C por trinta minutos, as lâminas com os cortes histológicos foram lavadas em solução tampão fosfato de sódio (PBS) pH 8,5; em uma segunda etapa, as mesmas foram cobertas com anticorpo anti-camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína e incubadas novamente nas mesmas condições. As lâminas novamente foram lavadas e montadas com glicerina tamponada e lamínulas para exame ao microscópio com luz ultravioleta. Essa mesma técnica foi também utilizada para o diagnóstico diferencial, sendo que neste caso foi utilizado o anticorpo monoclonal direcionado contra o vírus de BVD.

Imunoperoxidase indireta (IPX)

Cortes histológicos foram processados e

fixados da mesma forma daqueles para a IFI, alterando-se apenas os reagentes para a revelação da prova, que foram anticorpo anti-vírus de PSC produzidos em suínos (MAA¹), e na segunda etapa um anticorpo anti-IgG de suíno conjugado com a enzima peroxidase (anti-pig-HRPO), baseada na técnica de SAUNDERS (1977).

Isolamento viral

Células das linhagens PK 15 - CCL 33 (ATCC², 2000) célula epitelial de rim normal de suíno adulto e MDBK- CCL 22 (ATCC², 2000) célula epitelial de rim normal de bovino adulto, foram utilizadas para o isolamento dos vírus da PSC e BVD, respectivamente.

O meio de crescimento utilizado foi EAGLE (EAGLE, 1955) acrescido de penicilina (200UI/mL), estreptomicina (0,2mg/mL), anfotericina B (1,25mg/mL), L-glutamina (0,3mg/mL) e 10% de soro fetal bovino livre de anticorpos contra o vírus da BVD (CASTRO *et al.*, 1997).

Os fragmentos de órgãos foram macerados separadamente em gral, suspensos a 20% em solução de tampão fosfato, pH 7,2 com penicilina (200UI/mL), estreptomicina (0,2mg/mL) e anfotericina B (1,25mg/mL), deixados por 1 hora a temperatura ambiente, quando foram então centrifugados sob refrigeração a 6000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante, foi então usado como inóculo nas diluições de 1:10 e 1:100 em meio de crescimento EAGLE e inoculado em microplacas de poliestireno (50mL/poço) em oito repetições.

Procedeu-se, então, a adição de 100mL de suspensão celular, em média com 200.000 células por mililitro, a cada poço, em placas separadas MDBK para BVD e PK15 para PSC. As placas contendo a suspensão celular e o inóculo foram incubadas em estufa úmida a 37° C, com 5% de CO₂ por 15 a 96 horas, o mesmo procedimento foi realizado em tubos de Leighton. Retiradas da estufa, as células foram fixadas às placas por 4 horas, em estufa seca a 37° C, e reveladas pela técnica de IPX como já descrito, uma vez que estes vírus não produzem efeito citopático. No caso dos tubos de Leighton, as lamínulas foram retiradas e as células fixadas com acetona P.A. por 10 minutos a -20° C e reveladas por imunofluorescência indireta com

anticorpos monoclonais direcionados contra os vírus de BVD e PSC.

Ensaio imunoenzimático para captura de antígeno – ELISA

Foi utilizado um kit comercial de ELISA³ para captura de antígeno de PSC, no qual o soro hiperimune anti-PSC vírus é adsorvido à placa.

As suspensões, a 20%, dos diferentes fragmentos de órgãos a testar foram adicionadas às placas 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 a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, adicionados do substrato cromógeno (Tetrametilbenzidina) e incubadas à temperatura ambiente por mais 15 minutos até o desenvolvimento da cor, quando então a reação foi bloqueada com solução de parada (solução a 0,5 N de ácido sulfúrico). A medida da absorbância foi feita em espectrofotômetro³ com filtro de comprimento de onda de 450nm.

Ensaio imunoenzimático monoclonal para detecção de anticorpos– ELISA

Para a detecção de anticorpos no soro sanguíneo foi realizada a prova de ELISA Ceditest for CSFV-Ab³ (COLIJN *et al.*, 1997).

O Ceditest – CSFV é um ELISA de competição. Os reagentes-chave usados nesse kit são dois anticorpos monoclonais direcionados contra o maior determinante antigênico do envelope do vírus da Peste Suína Clássica, a glicoproteína E2 (GP-55). O Ceditest-CSFV usa os dois anticorpos monoclonais para medir a ligação dos anticorpos contra PSC 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 (WILSON & NAKANE, 1978). O

¹ MAA - Laboratório de Controle de Qualidade de Vacinas do Ministério da Agricultura, Castro, Paraná

² ATCC – American Type Culture Collection. University Boulevard, Manassas

³ Commercially available test. ID-Lelystad, Holanda

antígeno usado no kit é expressado em células de inseto infectadas com baculovírus contendo o gene da glicoproteína E2 da PSC inserido em seu genoma.

A leitura é feita em espectrofotômetro⁴ com filtro de comprimento de onda 450nm (Absorbância_{450nm}), até 10 minutos depois de interrompida a reação.

Neutralização viral com revelação por imunoperoxidase para PSC (Neutralization peroxidase-linked assay - NPLA)

A prova de neutralização viral foi processada em microplacas de poliestireno com 96 poços (TERPSTRA *et al.*, 1984). Os soros a serem testados foram primeiramente inativados por 30 minutos à temperatura de 56° C, para inativar o complemento e possíveis inibidores não específicos.

A prova de NPLA utiliza o cultivo celular como substrato. No caso da PSC, são utilizados cultivos celulares de PK15 (CCL-33) susceptíveis ao vírus da PSC. A cepa viral padrão utilizada foi Alfort 19 (AYNAUD, 1968).

Os soros a testar foram selecionados e diluídos desde 1:5 até 1:80, e então, adicionados 50 mL à placa em duplicata, e 50mL da suspensão de diluição de trabalho do vírus, ou seja 100 TCID₅₀ para cada poço, incubados em estufa 37° C e adicionados de suspensão contendo entre 150.000 e 300.000 células/mL. Após 48 horas de incubação, as células foram fixadas à placa e reveladas como descrito anteriormente na técnica de isolamento viral.

Neutralização viral para BVD (NPLA)

A prova de NPLA para BVD utiliza como substrato o cultivo celular da linhagem MDBK (CCL-

22), que é susceptível ao vírus da BVD. A cepa viral utilizada foi Van Ee (WENSVOORT *et al.*, 1988; TERPSTRA & WENSVOORT, 1988; WENSVOORT *et al.*, 1989).

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

Resultados

Seis dos sete animais testados pelas técnicas de IFI e IPX apresentaram resultados positivos em fragmentos de tonsilas e baço. O animal que apresentou resultado negativo, ou seja, sem detecção de antígeno, foi positivo para presença de anticorpos no soro sanguíneo pela técnica de ELISA e neutralização viral com título $\geq 1:80$, ao contrário dos outros seis animais que apresentaram resultado positivo para detecção de antígeno, nos quais não foi possível detectar a presença de anticorpos neutralizantes. Foram coincidentes os resultados encontrados na técnica de isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK 15, IFI e IPX (Tabela 1).

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 neutralização viral, foram negativas.

A detecção de antígeno viral em cultivo celular 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 1:20.480/50mL ou 10^{-6,41}/mL.

Tabela 1 - Detecção de antígeno viral em amostras de fragmentos de órgãos e de anticorpos no soro sanguíneo de sete animais oriundos do foco de peste suína clássica em outubro de 1997, em São Miguel do Iguazu, Paraná, Brasil

Animais(1)	DETECÇÃO DE ANTÍGENO		DETECÇÃO DE ANTICORPOS	
	IPX e IFI	Isolamento viral	ELISA	NPLA
Nº 1	+	+	-	-
Nº 3	+	+	-	-
Nº 4	+	+	-	-
Nº 5	+	+	-	-
Nº 6	+	+	-	-
Nº 7	-	-	+	+(2)
Nº 8	+	+	-	-

(+) positivo (-) negativo

(1) fragmentos de tonsilas ou baço

(2) título de anticorpos 1: 80

IPX – imunoperoxidase

IFI – imunofluorescência indireta

NPLA – neutralização com revelação por imunoperoxidase

⁴ Modelo 340 ATC da SLT Labinstruments Ges.m.b.H. – Viena, leitora de placas de ELISA

As amostras de fragmentos de órgãos foram armazenadas no laboratório sob refrigeração em temperaturas variando entre -20° e -80° C. Entre novembro de 1999 e abril de 2000, essas amostras foram retestadas pelas técnicas de isolamento viral em cultivo celular da linhagem PK15 e ELISA para captura de antígeno, confirmando os achados das provas iniciais. Algumas amostras foram negativas para isolamento viral em cultivo celular, mas tiveram detecção de antígeno pela técnica de ELISA (Tabela 2). Na Tabela 2, estão também relacionados os resultados encontrados durante o primeiro isolamento viral, a partir das tonsilas ou baço.

Foi realizado o mapeamento genético do vírus isolado no Paraná pelo ID-DLO (Institute for Animal Science and Health), na Holanda. O genoma deste vírus foi comparado a um painel padrão contendo variantes de genomas de PSC. O resultado foi uma pequena correlação entre vários genomas, 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 pode ser enquadrado em nenhuma das cepas em questão.

Tabela 2 - Detecção de antígeno em amostra 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	nr	nr	+	+
Linfonodo	nr	nr	+	+
Rim	nr	nr	+	+
Nº 3				
Baço	+	+	+	+
Intestino	nr	nr	+	+
Fígado	nr	nr	+	+
Linfonodo	nr	nr	+	+
Rim	nr	nr	-	+
Nº 4				
Tonsila	+	+	+	+
Baço	nr	nr	+	+
Intestino	nr	nr	+	+
Fígado	nr	nr	+	+
Rim	nr	nr	+	+
Nº 5				
Tonsila	+	+	-	+
Baço	nr	nr	+	+
Intestino	nr	nr	+	+
Fígado	nr	nr	+	+
Rim	nr	nr	-	+
Nº 6				
Tonsila	+	+	-	+
Baço	nr	nr	-	-
Bexiga	nr	nr	-	-
Fígado	nr	nr	-	-
Intestino	nr	nr	-	+
Rim	nr	nr	-	-
Nº 7				
Tonsilas	-	-	-	-
Nº 8				
Tonsila	+	+	+	+
Linfonodo	nr	nr	+	+

positivo = +

negativo = -

não realizado = nr

Discussão

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 até um 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 N° 6 (Tabela 2) pode ser usado como exemplo destas afirmações, pois, seja por isolamento viral em cultivo celular ou ELISA-Ag, só foi possível detectar o antígeno viral a partir das amostras de tonsilas e intestino (porção distal do íleo).

Estes achados vêm reafirmar a importância do material que é enviado ao laboratório, cabendo lembrar 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 linfonodos regionais (VAN OIRSCHOT, 1980).

Conforme ilustra a Tabela 2 nos animais N° 3, 5 e 6, os melhores resultados para a detecção viral, após dois anos, foram encontrados através da técnica de ELISA-Ag, pois independe da

viabilidade do vírus em replicar-se, o que não se aplica ao isolamento viral em cultivo celular. Sendo assim, a técnica de ELISA-Ag pode ser utilizada com maior segurança para materiais, cuja conservação não tenha sido adequada ou mesmo no caso de animais encontrados mortos, o que se aplica para suídeos silvestres.

Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas mostraram grande precisão para o diagnóstico da Peste Suína Clássica.

Apesar da cepa isolada apresentar maiores semelhanças com a cepa Brescia e Cepa China, não pode ser enquadrado como nenhuma delas, pois os animais com idade inferior a três meses mostraram-se mais sensíveis. Segundo VAN OIRSCHOT (1980), a cepa Brescia é altamente virulenta, acometendo suínos de todas as idades, produzindo doença aguda e causando a mortalidade aproximada de 100%. Por outro lado, a cepa China é considerada avirulenta para suínos de todas as idades, incluindo fetos e animais imunossuprimidos com corticosteróides.

A cepa de vírus de PSC, isolada durante o foco de 1997 no Paraná, apresentou características de virulência que podem ser enquadradas como moderada, uma vez que num mesmo grupo de animais, a incidência maior ocorreu naqueles com idade inferior a três meses. Ainda, neste grupo mais susceptível, foram encontrados animais em fase de recuperação da doença, como foi o caso do animal N° 7 (Tabela 1), no qual o nível de anticorpos neutralizantes foi detectável, eliminando a presença de vírus viável para o isolamento em cultivo celular ou ELISA-Ag. Os animais que tiveram a manifestação clínica de forma mais aguda, com mortalidade entre 7 e 14 dias, não demonstraram anticorpos neutralizantes detectáveis, concordando com os achados de VAN OIRSCHOT (1980).

Agradecimentos

Agradecimento especial ao Dr. Marinus Bloemraad do Institute for Animal Science and Health (ID-Lelystad – Holanda), pelo suporte técnico, tanto em termos de material didático como em insumos para a realização deste estudo.

Referências

- AYNAUD, J. M. Etude de la multiplication in vitro d'un clone du virus de la peste porcine. *Rech. Véter.*, n. 1, p. 25-36, 1968.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Boletim de defesa sanitária animal*, Peste Suína Clássica. Número especial, Brasília-DF. 1980.
- CASTRO, M.D.; STOFFREGEN, W.C.; BRIGMAN, G.P. *et al.*. A method to detect bovine diarrhea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining. *J.Am.Diagn.Invest.*, n. 9, p. 427- 431, 1997.
- COLLIJN, E.O.; BLOEMRAAD, M.; WENSVOORT, G. An improved ELISA for detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, v. 59, p.15-25, 1997.
- D'APICE, A.M. Peste Suína (Hog Cholera). Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura, Instituto Biológico, São Paulo. *Folheto* n. 104, 28 p., 1945.
- EAGLE, H. *Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture*. Science, v. 122, p. 501-504, 1955.
- OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Classical Swine Fever*, Manual of Standards, Cap.2.1.13, 2000.
- 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, Divisão de Defesa Sanitária Animal. *Formulários de envio de amostras 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 em 1997*. Curitiba, 1997c.
- PARANÁ, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural. *Diagnóstico Pecuíario 1999*. Curitiba, 1999.
- SAUNDERS, G. C. Development and evaluation of an enzyme-labelled antibody test for rapid detection of Hog Cholera antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v 38, p. 21-25, 1977.
- TERPSTRA, C. Hog Cholera: an update of present knowledge. *British Veterinary Journal*, v.147, p. 397-406, 1991.
- TERPSTRA, C.; BLOEMRAAD, M.; GIELKENS, A.L.J. The neutralizing peroxidase-linked assay for detection of antibody against swine fever virus. *Vet.Microbiol.*, v.9, p. 113-120, 1984.
- TERPSTRA, C.; WENSVOORT, G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhea virus associated with signs resembling swine fever. *Res.Vet. Sci.*, v. 45, p. 137-142, 1988.
- 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. *Vet. Microbiol.*, v 8, p. 321-361, 1983.
- VAN OIRSCHOT, J.T. Hog Cholera. In: LEMAN, A.D. *et al.*. *Disease of Swine*. 7.ed. Ames, Iowa: A.D., 1992. p. 274-285.
- VAN OIRSCHOT, J.T.; TERPSTRA, C. Virus infectious of porcine. In: HORZINEK, M.E. *Virus infectious of vertebrates*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1989. p. 113 130.
- 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. 222-233.
- WENSVOORT, G.; BLOEMRAAD, M.; TERPSTRA, C. An enzyme immunoassay employing monoclonal antibodies and detecting specifically antibodies to classical swine fever virus. *Vet. Microbiol.*, v. 17, p. 129-140, 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. *Vet. Microbiol.*, v. 12, p. 101-108, 1986.
- WENSVOORT, G.; TERPSTRA, C.; DE KLUYVER, E.P. Characterization of porcine and some ruminant pestiviruses by cross-neutralization. *Vet. Microbiol.*, v. 20, p. 291-306, 1989.
- 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.

Recebido para publicação em 03/06/00.

Received for publication on 03 June 2000.

Recibido para publicación em 03/06/00.

Aceito para publicação em 30/11/00.

Accepted for publication on 30 November 2000.

Accepto para publicación em 30/11/2000.