

# COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES DE IMUNOELETTROSMOFORESE, SORONEUTRALIZAÇÃO E MICROIMUNODIFUSÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE AUJESZKY<sup>1</sup>

PAULO M. ROEHE<sup>2</sup>, HERMANN E. A. BRUCHMANN<sup>2</sup>, LILIANE G. OLIVEIRA<sup>2</sup>, ELIANE V. BANGEL<sup>2</sup>, RICARDO M. MARTINS<sup>2</sup> e TELMO VIDOR<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Roehé P.M., Bruchmann H.E.A., Oliveira L.G., Bangel E.V., Martins R.M. & Vidor T. 1986. [Comparison of immunoelectromorphosis, serum neutralization and immunodiffusion in the serological diagnosis of Aujeszky's disease]. Comparação entre os testes de imunoletrosmoforesse, soroneutralização e imunodifusão no diagnóstico sorológico da doença de Aujeszky. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 7(2):43-46. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90000, Brazil.

In an attempt to determine the most suitable screening test for the identification of antibodies to Aujeszky's disease virus in large scale, immunoelectromorphosis (IEOP), serum neutralization in microtitre plates (SN) and agar gel immunodiffusion (MID) were adapted to our working conditions and compared. For the comparison between IEOP and SN, 575 field sera of swine from the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul were used. The IEOP detected 358 (100%) positive sera, whereas SN detected 293 (81,84%) positives and 35 (9,78%) negatives. In 30 (8,38%) samples no results could be obtained with SN due to contamination or cell culture toxicity.

In 217 (100%) samples negative by IEOP, 199 (91,7%) were negative by SN. The remainder 18 (8,29%) allowed no SN result.

MID was included in the comparison by testing 386 sera by the three methods. From 285 (100%) IEOP positive sera, SN detected 226 (79,3%) positives, 31 (10,9%) negatives and 28 (9,8%) without result. MID detected 193 (67,7%) positives, 84 (29,5%) negatives and 8 (2,8%) allowed no conclusive result. In 101 (100%) IEOP negative sera, all were also negative by MID; 95 (94,05%) were negative by SN and 6 (5,94%) gave no result.

Considering the SN results as standard, the IEOP has shown to be a useful technique for screening particularly for laboratories where cell culture facilities are not available. The positive sera have, however, to be retested either by SN or ELISA, in order to be sure of its positivity, since about 10% of samples were false positives. The MID, despite simpler than IEOP, showed 15,79% false negatives, what might compromise its use as a preliminary test for massive serology.

**INDEX TERMS:** Immunoelectromorphosis, serum neutralization, microimmunodiffusion, comparative tests, Aujeszky's disease.

**SINOPSE.**- Com o objetivo de determinar o teste de triagem mais eficaz para a identificação de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky em larga escala, imunoletrosmoforesse (IEOF), soroneutralização em microtécnica (SN) e imunodifusão em gel de agar foram adaptados às nossas condições de trabalho e comparados. Para a comparação entre IEOF e SN, 575 soros de campo de suínos dos Estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foram utilizados. A IEOF detectou 358 (100%) soros positivos, enquanto a SN detectou 293 (81,84%) positivos e 35 (9,78%) negativos. Em 30 (8,38%) amostras, nenhum resultado pôde ser obtido com a SN devido a contaminação ou toxicidade aos cultivos celulares. Em 217 (100%) amostras negativas por IEOF, 199 (91,7%) foram negativas por SN. As 18 (8,29%) restantes não permitiram resultado por SN.

MID foi incluída na comparação através da testagem compa-

rativa de 386 soros pelos três métodos. De 285 (100%) soros IEOF positivos, a SN detectou 226 (79,3%) positivos, 31 (10,9%) negativos e em 28 (9,8%) não foi obtido resultado. A MID detectou 193 (67,7%) positivos, 84 (29,5%) negativos e 8 (2,8%) soros não permitiram um resultado conclusivo. Em 101 (100%) soros IEOF negativos, todos foram também negativos por MID; 95 (94,05%) foram negativos por SN e 6 (5,94%) não permitiram resultado.

Considerando os resultados da SN como padrão, a IEOF mostrou ser uma técnica útil para triagem, particularmente em laboratórios onde não são trabalhadas técnicas de cultivo celular. Os soros positivos necessitam, no entanto, ser retestados por SN ou ELISA, a fim de serem confirmados resultados positivos, uma vez que em torno de 10% das amostras foram falsos positivos. A MID, apesar de se constituir em uma técnica mais simples que a IEOF, mostrou 15,79% de falsos negativos, o que pode comprometer seu uso como um teste preliminar para sorologia em larga escala.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Imunoletrosmoforesse, soroneutralização, microimmunodifusão, testes comparativos, doença de Aujeszky.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 29 de janeiro de 1987.

<sup>2</sup> Equipe de Virologia e Imunologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Caixa Postal 2076, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90000.

## INTRODUÇÃO

A Doença de Aujeszky (DA) ou Pseudo-raiva é uma enfermidade provocada por um vírus do grupo herpes, Alpha herpesvirus porcino I. Ela se manifesta em diferentes espécies animais, notadamente em suínos, bovinos, ovinos, caprinos e felinos, embora seja considerada primariamente uma doença de suínos (Gustafson 1981). Economicamente é nessa espécie que a DA se reveste de maior importância. Perdas animais atribuídas à PR registram cifras superiores a 100 milhões de dólares (Gustafson 1981).

No Brasil, a DA foi primeiramente diagnosticada em 1912 (Carini & Maciel 1912) sendo que desde então surtos têm sido verificados esporadicamente em diversos Estados (Braga & Faria 1934, Carneiro 1950, Bauer 1955, Silva & Döbereiner 1960, Hipólito et al. 1960/61).

Em 1983 ocorreram surtos de maior gravidade da enfermidade no Estado de Santa Catarina (Romero et al. 1984), São Paulo (Lowenthal & Bordin 1981) e Minas Gerais (Santos et al. 1985), causando vultosas perdas, estimadas por Santos et al. (1985) e Protas et al. (1986).

Métodos de diagnóstico sorológico de um grande número de amostras são a base para o estabelecimento da estratégia a ser adotada. Também é importante a identificação de animais positivos sorologicamente devido ao fato de que o vírus da DA pode manter-se em latência no animal infectado, podendo vir a eliminar o agente em ocasião de "stress", tornando-se fonte de contágio e perpetuação da enfermidade nos rebanhos (Gustafson 1981).

Dentre as técnicas disponíveis para o diagnóstico sorológico da DA, aquelas que têm recebido maior atenção no Brasil são a soroneutralização em microtécnica (SN), a microimunodifusão (MID) e o teste de absorção imunoenzimática (ELISA), sendo que este último ainda em caráter experimental (IPVDF, dados não publicados).

Em nosso laboratório foi adaptada a metodologia do diagnóstico sorológico da DA pelo método de Imunoeletrosmofores (IEOF) com base no descrito por Papp-Vid & Dulac (1979). Com o objetivo de utilizar a infraestrutura montada para o diagnóstico de triagem para Peste Suína Africana no País, procurou-se adequar a técnica às nossas condições de trabalho, permitindo assim que os vários laboratórios já equipados para executar a IEOF pudessem paralelamente realizar o "screening" para a DA.

O presente trabalho visou determinar a sensibilidade e especificidade da IEOF frente às duas outras técnicas mais utilizadas no País (SN e MID).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Células

Células RK-13 foram cultivadas em meios EAGLE-MEM suplementado com 10% de soro de cabra e mantidas em passagens semanais na razão de 1:3.

### Soros

Foram coletados 575 soros, provenientes de suínos dos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e utilizados nas provas de IEOF e SN. Na comparação entre IEOF, SN e MID, foram testados 386 soros. Na comparação entre as formulações utilizadas na prova de MID foram testados 23 soros positivos e um soro negativo pelas provas de IEOF e SN.

### Imunoeletrosmofores

**Antígeno.** Células RK-13 foram infectadas com a amostra do vírus NP (Bauer 1955) com uma multiplicidade de infecção 0,03. Após 48 horas os cultivos foram coletados apresentando aproximadamente 95% do efeito ci-

topático (ECP). Após três ciclos de congelamento e descongelamento, a suspensão foi centrifugada a 1.000 x G por 30 minutos. O sobrenadante foi tratado com solução saturada de Sulfato de amônia segundo Gutekunst et al. (1977). Após precipitação por uma noite, a suspensão foi centrifugada e o pellet ressuspenso em 1:10 do volume inicial. Após exaustiva diálise frente a solução salina tamponada (pH 7,4), o antígeno foi desidratado em polietilenoglicol (PEG PM 20.000) ou sacarose até 1/200 do volume inicial.

**Testes de IEOF.** Os testes foram realizados seguindo basicamente a técnica descrita por Pan et al. (1972). Resumidamente, Agarose 0,6% em tampão Barbital e colocada sobre as placas-suporte para 6 lâminas 25 x 75 mm (Gezmann Inst. Co., USA). Após, foram feitos orifícios de 3 mm de diâmetro, distando 12 mm entre si. A eletroforese foi realizada a 40 mA por placa durante 30 minutos. Em cada corrida foram incluídos controles positivos e negativos. A presença de linhas de precipitação entre antígeno e soro foi considerada como resultado positivo.

### Soroneutralização em microtécnica

Para os testes de SN (Banks & Cartwright 1983) foram utilizadas placas de microtécnica com 96 orifícios. Os soros foram diluídos 1/2 e 1/4 em EAGLE-MEM, com dois orifícios por diluição, num volume de 25 µl. Após, 25 µl de uma diluição de vírus (cepa NP) contendo aproximadamente 100 DICT<sub>50</sub> foram colocados sobre as diluições de soro e incubados a 37°C por 60 minutos. Cincoenta microlitros de células RK-13 a uma concentração de 600.000 células/ml foram colocadas em cada orifício. Controles positivo e negativo bem como "back titrations" do vírus foram incluídos em cada bateria. As placas foram antes incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>.

A leitura das placas foi feita diariamente, sendo o resultado final lido após 5 dias. A inibição do ECP ao final desse período foi considerada como resultado positivo.

### Microimunodifusão

Devido a dados de literatura conflitantes quanto à metodologia da técnica de MID, diferentes formulações foram testadas:

- Gel com tampão Barbital: foi preparado de acordo com Pfeiffer & Schipper (1979), com concentração de NaCl: 0, 0,75M, 1,5M e 3M.
- Gel com tampão fosfato: preparado segundo Carnero (1982) com variação na concentração de NaCl de 0, 0,75M, 1,5M e 3M.
- Gel com tampão Tris: preparado como descrito por Gutekunst et al. (1977), com variações nas concentrações de NaCl como nos anteriores.

As provas de MID foram realizadas em placas de Petri plásticas com 10 cm de diâmetro, segundo Gutekunst et al. (1977).

Os critérios utilizados para a avaliação das diferentes preparações foram a presença e nitidez das linhas de precipitação.

Para os testes comparativos entre IEOF, SN e MID foi utilizada a formulação com tampão fosfato sem NaCl, em função dos resultados obtidos.

## RESULTADOS

Os resultados dos testes comparativos entre IEOF e SN estão representados no Quadro 1. Dos 575 soros testados, 358 (100%) foram positivos por IEOF. Na SN, 293 (81,84%) foram positivos, 35 (9,78%) negativos e 30 (8,38%) foram tóxicos aos cultivos celulares ou encontravam-se contaminados, impossibilitando a leitura de resultados.

Quadro 1. Comparação e avaliação dos testes de Imunoeletrosmofores (IEOF) e Soroneutralização em Microtécnica (SN) para a detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky (575 soros)

	IEOF		SN			
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Tóxicos	Contam.
Nº de soros	358	- <sup>a</sup>	293	35	19	11
%	100		81,84	9,78	5,31	3,07
Nº de soros	-	217	-	199	4	14
%		100		91,7	1,84	6,45

<sup>a</sup> -Sem reagentes.

Quadro 2. Comparação entre diferentes métodos de Microimunização (MID), de acordo com os critérios de presença de nitidez de linhas de precipitação (24 soros)

	Concentração de NaCl (M)			
	0	0,75M	1,5	3
Tampão Fosfato	++++	+++	++	+
Tampão Tris	+++	+++	++	+
Tampão Barbitol	±	±	±	±

Quadro 3. Comparação entre os testes de Imunoelctroforese (IEOF), Soroneutralização (SN) e Microimunodifusão (MID) na detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Aujeszky (DA) (386 soros)

	IEOF		MID			SN		
	Pos	Neg	Pos	Neg	S/r <sup>a</sup>	Pos	Neg	S/r
Nº de soros	285	-	193	84	8	226	31	28
%	100		67,7	29,5	2,8	79,3	10,9	9,8
Nº de soros	-	101	-	101	-	-	95	6
%		100		100			94,05	5,9

<sup>a</sup> S/r Sem resposta.

<sup>b</sup> - Nenhum soro reagente.

Quadro 4. Discrepâncias observadas entre Imunoelctroforese (IEOF), Soroneutralização (SN) e Microimunodifusão (MID) (386 soros)

	Resultados discrepantes observados					
	+IEOF -SN	+IEOF -MID	-IEOF +SN	+IEOF +SN	+IEOF -SN	-IEOF -SN
% de soros <sup>a</sup>	10,87	29,47	-	15,79	1,75	-

<sup>a</sup> Percentagem de soros com resultados discrepantes.

Dos 217 (100%) soros negativos por IEOF, 199 (91,7%) foram igualmente negativos por SN, sendo que os demais 18 (8,29%) não permitiram a obtenção de resultado.

O Quadro 2 mostra os resultados obtidos com diferentes formulações na execução da MID. Os critérios utilizados apontaram a preparação com tampão fosfato sem NaCl como a mais adequada, motivo pelo qual a mesma foi utilizada nos testes comparativos com as demais técnicas.

A comparação entre IEOF, SN e MID está representada no Quadro 3. Em 386 soros testados, 285 (73,83%) foram positivos pela IEOF. Dentre estes, 193 (50%) foram positivos por MID e 226 (58,54%) por SN. Oitenta e quatro (21,76%) soros positivos por IEOF foram negativos por MID.

Na SN, 31 (10,87%) dos soros IEOF positivos resultaram negativos, enquanto 28 (9,8%) não permitiram resultado por se encontrarem tóxicos aos cultivos celulares ou contaminados.

A IEOF identificou 101 (26,16%) soros negativos, que foram confirmados por MID. A SN confirmou o resultado negativo em 95 (24,61%) desses soros, sendo que os 6 restantes não permitiram a obtenção de resultado com esta técnica.

Considerando os 285 soros positivos em pelo menos um dos três testes, foi possível determinar a percentagem de discrepâncias observadas entre os resultados obtidos (Quadro 4). Em relação à SN, a IEOF revelou um índice de 10,87% de falsos positivos e nenhum falso negativo. A MID apresentou um índice de 1,75% de falsos positivos e 15,79% de falsos negativos.

## DISCUSSÃO

No estabelecimento de uma nova metodologia diagnóstica, vários parâmetros devem ser considerados, tais como sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e custos de implantação e execução da técnica. Outro aspecto fundamental a ser analisado é a sua aplicabilidade a estudos massivos, isto é, envolvendo grande número de amostras, a fim de permitir seu uso em larga escala.

A técnica padrão para o diagnóstico sorológico da DA tem sido a SN (Hill et al. 1977, Banks & Cartwright 1983) e, mais recentemente, a técnica de ELISA (Todd et al. 1981, Banks & Cartwright 1983).

No entanto, a aplicação prática em particular da técnica de ELISA traz problemas que se tornam difíceis de resolver com rapidez, em um país de dimensões continentais como o Brasil. Haveria a necessidade de equipagem de vários laboratórios para desenvolver a técnica, com sub-utilização do equipamento destinado a execução do IEOF. Conseqüentemente, os investimentos iniciais seriam bastante vultosos devido ao custo do equipamento, além do treinamento de pessoal necessário.

A técnica de IEOF apresentou resultados satisfatórios, se considerado como um método de "screening" de grande número de soros. A velocidade de processamento das amostras situou-se em torno de 90-120 minutos até a obtenção do resultado final, o que é inatingível com as demais. O custo de implantação da mesma seria praticamente nulo se utilizados os laboratórios já preparados para a execução da triagem sorológica para Peste Suína Africana. Além disso, a análise da sensibilidade da prova revelou que não foram encontrados falsos negativos, o que pesa em favor de sua utilização como teste preliminar. A sua especificidade fica comprometida com uma percentagem de aproximadamente 10% de falsos positivos em relação à SN (Quadros 1 e 3). Não obstante, permite a obtenção de resultados em soros que devido à toxicidade aos cultivos celulares ou à contaminação, seriam impraticáveis na SN.

Outros autores compararam a IEOF com a SN e/ou MID. Banks & Cartwright (1983) detectaram 95,31% de positivos com a IEOF, se considerada a SN como 100%, em 521 soros de campo. Esses autores detectaram ainda 91,4% de positivos com o MID. Papp-Vid & Dulac (1979) identificaram 100% de positivos tanto com IEOF como com SN. No entanto, foram examinados somente 50 soros. Tais diferenças possivelmente sejam devidas a diferenças nas metodologias empregadas no processamento das três técnicas.

O teste de MID, embora as diferentes variações testadas (Quadro 2) apresentou um índice de sensibilidade menor que o da SN. Estes falsos negativos obtidos comprometem seu uso como instrumento de triagem, pois uma percentagem de animais positivos (em nosso estudo 15,79%) não serão identificados. Não obstante, a MID foi usada para a detecção de plantéis infectados no Estado de Santa Catarina, com resultados satisfatórios (Romero 1984), desde que sejam conhecidas sua sensibilidade e especificidade (Thawley et al. 1982).

Nossos resultados permitem afirmar que o IEOF pode vir a ser uma técnica útil para levantamentos de triagem na sorologia da DA. O processamento de um grande número de soros poderia ser realizado nos laboratórios regionais já equipados para a execução da IEOF, sendo que os positivos seriam remetidos a centros de referência ou laboratórios capacitados para a execução da prova de SN ou ELISA. Isto acarretaria em um número menor de amostras sendo remetidas aos laboratórios de referência, sem os inconvenientes de serem obtidos falsos negativos nos testes

realizados nos laboratórios regionais e com um melhor aproveitamento da infra-estrutura laboratorial já disponível no País.

#### REFERÊNCIAS

- Banks M. & Cartwright S. 1983. Comparison and evaluation of four serological tests for detection of antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet. Rec.* 113:38-41.
- 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.
- Braga A. & Faria A. 1934. Paralysis Bulbar Infectuosa (Pseudorabia, Peste de coçar, doença de Aujeszky). *Bolm Inst. Vital Brazil, Rio de J.*, 16:3-23.
- Carini A. & Maciel J. 1912. La pseudoragie ou paralysie bulbaire infectieuse au Brésil. *Bull. Soc. Pathol. Exotique* 5:576-578.
- Carneiro V. 1950. Distribuição geográfica e freqüência da doença de Aujeszky no Brasil. *Biológico, S. Paulo*, 16(3):49-58.
- Carnero R. 1982. Peste porcina africana: conocimiento de la enfermedad. *Publ. Cient. nº 3, IICA Serie Salud Animal, San Jose, Costa Rica*. 244 p.
- Gustafson D.P. 1981. Herpesvirus diseases of mammals and birds: Comparative diagnosis, p. 205-265. In Kustak E. & Kurstak C. (eds) *Comparative Diagnosis of Viral Diseases, Vol. 3*. Academic Press, London.
- Gutekunst D.E., Pirtle E.C. & Mengeling W.L. 1977. 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., Mc Adaragh J.P., Scawright G.L., Solorzano R.F. & Stewart W.C. 1977. Recommended minimum standard for diagnostic tests employed in the diagnosis of pseudorabies (Aujeszky's disease). *Proc. 20th An. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, p. 375-390.
- Hipólito O., Silva J.M.L., Batista Jr. J.A. & Lima S.N. 1960/61. A doença de Aujeszky em suínos no Estado de Minas Gerais. *Arqs Esc. Sup. Vet., Belo Horizonte*, 13:61-67.
- Lowenthal C.F.W. & Bordin E.L. 1981. Aujeszky, um caso de campo. *Brasil Suinícola* 4:34-35.
- Pan I.C., De Boer C.J. & Hess W.R. 1972. African Swine Fever: application of immunoelectromorphosis for the detection of antibody. *Can. J. Comp. Med.* 36:309-316.
- Papp-Vid G. & Dulac G.C. 1979. Pseudorabies. Adaptation of the countercurrent immunoelectrophoresis for detection of antibodies in porcine serum. *Can. J. Comp. Med.* 43:119-124.
- Pfeiffer N.E. & Schipper I.A. 1979. Evaluation of Pseudorabies viral antigens in the agar gel immunodiffusion test. *Am. J. Vet. Res.* 40(4):595-598.
- Protas J.F.S., Sobestiansky J. & Soncini R.A. 1986. Custo de um surto da doença de Aujeszky. *Pesq. Agropec. Bras.* 21(7):757-761.
- Romero C.H., Rowe C.A., Provenzano G.L., Flores R.S., Brentano L. & Marques J.L.L. 1984. Distribuição e prevalência de anticorpos precipitantes para o vírus da doença de Aujeszky em plantéis suínos no Estado de Santa Catarina. *Pesq. Vet. Bras.* 4(4):123-127.
- Santos J.L., Ferreira L.F.A., Ribeiro M.F.B. & Faria J.E. 1985. Observações zootécnicas, sanitárias e econômicas de um surto da doença de Aujeszky em suínos em Minas Gerais, p. 130. In: *An. Congr. Bras. Vet. Espec. Suínos, Rio de Janeiro*.
- Silva R.A. & Döbereiner J. 1960. Nota sobre a doença de Aujeszky no município de Sapucaia, Estado do Rio de Janeiro. *Arqs Inst. Biol. Anim., Rio de J.*, 3:83-90.
- Tawley D.G., Johnson M.E., Solorzano R.F. & Wright J.C. 1982. Pseudorabies virus microimmunodiffusion test: validity determinations. *Proc. 25th An. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagnosticians*, p. 167-172.
- Tood D., Mc Nair J., McNulty M.S. & Mc Ferran J.B. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs. *Vet. Rec.* 109(24):534-537.