

Comparação dos métodos virológicos aplicados no diagnóstico da peste suína africana no Brasil, 1978*

Tânia Rosária Pereira Freitas¹⁺, Adriana Cavalcanti de Souza², Eduardo Gonçalves Esteves³ e Tânia Maria de Paula Lyra⁴

ABSTRACT. Freitas T.R.P., Souza A.C., Esteves E.G. & Lyra T.M.P. [Comparison of virological methods applied on african swine fever diagnosis in Brazil, 1978.] Comparação dos métodos virológicos aplicados no diagnóstico da peste suína africana no Brasil, 1978. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(3):255-263, 2015. Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Avenida Rômulo Joviano, s/n, Caixa postal 35/50, Pedro Leopoldo, MG 33600-000, Brasil. taniafrei@hotmail.com

The techniques of leucocytes haemadsorption (HAD) for the African Swine Fever (ASF) virus isolation and the fluorescent antigens tissue samples (FATS) for virus antigens detection were implanted in the ASF eradication campaign in the country. The complementary of techniques was studied considering the results obtained when the HAD and FATS were concomitantly applied on the same pig tissue samples. The results of 22, 56 and 30 pigs samples from of the States of Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP) and Paraná (PR), respectively, showed that in RJ 11 (50%); in SP, 28 (50%) and in PR, 15 (50%) samples were positive in the HAD, while, RJ, 18 (82%); SP, 33 (58%) and PR, 17 (57%) were positive in the FATS. In the universe of 108 samples submitted to both the tests, 83 (76.85%) were positive in at least one of the tests, which characterized ASF positivity. Among the positive samples, 28 (34%) have presented HAD negative results and 15 (18%) have presented FATS negative results. The achievement of applying simultaneously the both tests was the reduction of false-negative results, conferring more ASF accurate laboratorial diagnosis, besides to show the tests complementary. This aspect is fundamentally importance concern with a disease eradication program to must avoid false negative results. Evidences of low virulence ASFV strains in Brazilian ASF outbreaks and also the distribution of ASF outbreaks by the mesoregions of each State were discussed. Public political action to avoid ASFV re-introduction should be thought and established. The successful experience of 1978 can be taken advantage for the country and for the outside.

KEY WORDS. African swine fever (ASF), laboratory diagnosis, HAD and FATS, epidemiology.

RESUMO. As técnicas de hemadsorção (HAD) para o isolamento do vírus da Peste Suína Africana (PSA) e a fluorescência em amostras de tecido de suínos (FATS) para detecção de antígenos virais foram implantadas na campanha de erradicação da PSA no país. A aplicação das duas técnicas foi ava-

* Recebido em 21 de maio de 2013.

Aceito para publicação em 15 de maio de 2014.

¹ Bióloga, PhD. Área de Ciências Exatas e da Natureza, Laboratório Nacional Agropecuária (LANAGRO/MG), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Avenida Rômulo Joviano, s/n, Caixa postal 35/50, Pedro Leopoldo, MG 33600-000, Brasil. *Autora para correspondência, E-mail: taniafrei@hotmail.com

² Médica-veterinária. Divisão de Sanidade dos Suídeos, Departamento de Saúde animal, MAPA, Esplanada dos Ministérios, Bloco D Anexo A, sala 306, Brasília, DF 70043-900, Brasil. E-mail: adriana.cavalcanti@agricultura.gov.br

³ Farmacêutico Bioquímico, MSc. LANAGRO/MG, Avenida Rômulo Joviano, s/n, Caixa postal 35/50, Pedro Leopoldo, MG 33600-000. E-mail: eduardo.esteves@agricultura.gov.br

⁴ Médica-veterinária, PhD. Autônoma. Consultora em Defesa Agropecuária. Confederação Nacional de Agricultura e Pecuária do Brasil, CNA, SGAN Quadra 601, Módulo K, Brasília, DF 70830-021. E-mail: taniahyra@terra.com.br

liada considerando os resultados obtidos quando o HAD e FATS foram concomitantemente aplicados nas mesmas amostras de tecido de suíno. Os resultados de 22, 56 e 30 amostras de suínos oriundos dos Estados do Rio de Janeiro (RJ), de São Paulo (SP) e do Paraná (PR), respectivamente, apontaram que no RJ 11 (50%); em SP, 28 (50%) e no PR, 15 (50%) amostras foram positivas no HAD. Enquanto, RJ, 18 (82%); SP, 33 (58%) e PR, 17 (57%) foram positivas no FATS. No universo de 108 amostras submetidas a ambos os testes, 83 (76,85%) foram positivas em, pelo menos um dos testes, o que caracterizava positividade para PSA. Dentre as amostras consideradas positivas, 28 (34%) apresentaram resultado negativo para HAD e 15 (18%) apresentaram resultado negativo para FATS, a partir do que se conclui que a realização de ambos os testes implicam na redução de resultados finais falso-negativos, conferindo um diagnóstico mais preciso da doença nos rebanhos além de mostrar a complementaridade dos testes. Este aspecto é de fundamental importância num programa cujo objetivo é erradicação da doença, o que implica em evitar o risco de um diagnóstico falso-negativo. As evidências de cepas de baixa virulência nos focos de PSA ocorridos no país como também a distribuição dos focos de PSA pelas mesorregiões de cada Estado foram discutidas. Políticas públicas que previnam a reintrodução do VPSA devem ser pensadas e estabelecidas. A experiência bem-sucedida de 1978 pode ser aproveitada como base para o país e para o exterior.

PALAVRAS-CHAVE. Peste suína africana (PSA), diagnóstico laboratorial, HAD e FATS, epidemiologia.

INTRODUÇÃO

A Peste suína africana (PSA) é uma virose hemorrágica, contagiosa e letal, que afeta suínos de todas as idades. Em 2007, surtos de PSA ocorreram na Geórgia, Cáucaso, rapidamente o vírus se disseminou para os países vizinhos chegando à Rússia onde já atinge mais de 18 Estados (OIE-WAHIS 2013). Não obstante, o número de surtos de PSA vem crescendo no continente Africano desde meados dos anos 90, com o agravante que vários surtos ocorreram em países do leste africano que não tinham histórico de infecção com PSA, como Costa do Marfim (1996), Nigéria (1997), Togo (1997), Gana (1999), Burkina Faso (2003), Chade (2010, 2011). E nas Ilhas de Madagascar (1998) e Maurício (2007) no oceano Índico. Na Nigéria a PSA se tornou endêmica desde 2008 (Sanchez-Vizcaíno et al. 2012).

A PSA em suínos domésticos pode se desenvolver nas formas: aguda, hiper aguda (per aguda), crônica e subclínica (inaparente) dependendo da dose e da virulência da cepa viral infectante e de fatores dos animais como as condições sanitárias em geral, idade, sexo (Mebus & Schlafer 1982, Lyra 2006). A forma aguda da PSA é associada a cepas virais de alta virulência e os suínos infectados desenvolvem febre alta, hemorragia nos órgãos do sistema retículo endotelial e índices de mortalidade no rebanho de 90-100%, enquanto, as formas crônicas e subclínicas, associadas a cepas de baixa virulência, o índice de mortalidade pode variar de 30-70% (OIE, 2012) e de 0 - 25% em animais experimentalmente inoculados (Mebus & Schlafer 1982).

O agente etiológico da PSA denominado Vírus da PSA (VPSA) é o único membro da família Asfaviridae no gênero Asfavirus. O VPSA contém um genoma DNA de dupla-fita, linear, complexo e de replicação citoplasmática (Yanez et al. 1995). O virion apresenta um capsídeo icosaédrico regular envolto por um envelope lipoprotéico, de onde emerge a única glicoproteína viral que está associada ao fenômeno de hemadsorção viral (Iyer et al. 2006). O comprimento da molécula de DNA do VPSA varia de 170 to 190kb dependendo do isolado (Nix et al 2006, Villiers et al. 2010). Independente da variação da virulência das cepas virais somente um sorotipo do vírus foi reconhecido. Os animais infectados podem sobreviver a PSA e produzir anticorpos contra o VPSA que podem ser diagnosticados em levantamentos sorológicos em sete a dez dias após a infecção. Nas regiões onde o vírus é endêmico ou em infecções causadas por cepas de baixa virulência o estudo sorológico é recomendado no reconhecimento de novos focos. (Pan et al. 1972, OIE 2012).

No Brasil, vários surtos de PSA ocorreram no final dos anos 70, sendo o foco "índice" diagnosticado na granja de suínos denominada Floresta, na cidade de Paracambi no Estado do Rio de Janeiro, no ano de 1978. A suspeita clínica de PSA foi confirmada pelo exame laboratorial das amostras de suínos do surto de Paracambi em Plum Island Animal Disease Center, PIADC- US (Lyra 1981).

Em junho 1978 foi implantado o Laboratório de Diagnóstico da PSA (LDPSA) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). No mesmo mês o LDPSA recebeu amostras de várias regiões do país. O maior número de amostras veio dos Estados das regiões sudeste e do sul do país (Andrade 1980). O diagnóstico foi realizado segundo o padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), as técnicas de Hemadsorção (HAD)

em leucócitos de suínos para o diagnóstico e isolamento viral e a imunofluorescência em impressões ou esfregaços de tecidos para a detecção de antígenos virais (FATS) foram implantadas sob a consultoria de vários expertos europeus e norte americanos. O VPSA foi isolado massivamente nos meses de junho e julho de 1978 em amostras oriundas de vários Estados principalmente do Estado do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Andrade 1981). No início do funcionamento do LDPSA, a primeira técnica implantada aplicada para o isolamento viral foi a HAD. As primeiras amostras de vírus isoladas pela HAD foram oriundas de suínos de um lixão em Teresópolis (Machado Jr 1990). Em meados de junho, as duas técnicas, HAD e FATS, já estavam sendo aplicadas na detecção e diagnóstico viral (Freitas & Lyra 2010, 2011). A implantação das duas técnicas era o padrão em 1978, contudo como metodologias com fundamentos diferentes, requerem conhecimentos e equipamentos distintos para a realização do diagnóstico da PSA. Desde 1984 Brasil está livre da PSA (Lyra 2006), contudo, na atualidade, a PSA se dispersa por vários países com índices de desenvolvimento diferenciados, mas especialmente com alto índice de pobreza e que se agrava com a ocorrência da PSA em seus rebanhos de suínos, principalmente na África (Sanchez-Vizcaíno et al. 2012). Como as trocas mercadológicas e as viagens turísticas ampliaram-se nos últimos anos, o risco da ocorrência da doença em regiões livres é significativo. Conseqüentemente, a necessidade de estabelecer métodos seguros para o diagnóstico laboratorial da PSA é preponderante tanto na prevenção da infecção como em uma situação emergencial. As técnicas HAD e FATS requerem laboratórios simples para serem implantadas como também são facilmente analisadas. Embora, os métodos moleculares possam e devam ser aplicados, em situações de dúvidas, a Organização Mundial de Saúde Animal recomenda a inoculação em leucócitos e a observação da hemadsorção de eritrócitos para o isolamento viral como também o FATS para o diagnóstico de antígenos virais (OIE 2012).

Neste estudo, avaliamos se a implantação concomitante das duas técnicas é importante para obtenção resultados mais completos e seguros. Com esse objetivo, a complementaridade das técnicas foi avaliada pela análise dos resultados do isolamento viral realizado pela técnica HAD e a detecção de antígenos virais pela técnica FATS, na experiência brasileira de 1978. Amostras de tecido de suíno testadas simultaneamente pelas duas técnicas nos meses junho e julho, oriundas de diferentes mesor-

regiões dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná foram classificadas e a frequência de positividade e negatividade comparadas inferindo a relação entre os dois métodos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O LDPSA iniciou suas atividades em 12 de Junho de 1978 durante a fase emergencial do Programa Nacional de Erradicação da PSA. De 12 de junho a 28 de Dezembro, 1978, 3803 amostras de tecidos, sangue e soro foram enviadas ao LDPSA. Nos meses de junho e julho, período quando o isolamento viral foi intensivo, o LDPSA recebeu 390 amostras tecidos e soros de suínos de várias regiões do país, sendo que 251 de suínos de diferentes mesorregiões do Estado do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Freitas e Lyra 2011). Deste total, foram selecionadas 108 amostras de tecido de suínos que haviam sido testadas simultaneamente pela HAD e FATS.

Diagnóstico Laboratorial do VPSA

As técnicas de Hemadsorção em leucócitos (HAD, do inglês haemadsorption test) e de Fluorescência em Amostras de Tecidos de Suínos ou em inglês "Fluorescence Animal Tissue Sample" (FATS) foram implantadas para o diagnóstico viral em fragmentos tonsilas, linfonodos, baço, e fígado. O diagnóstico diferencial de vírus da peste suína clássica (VPSA) foi realizado pelo isolamento viral em PK15 revelado pela prova de Imunofluorescência indireta IIF (Freitas et al. 2006) e por FATS.

Isolamento viral pela técnica de Hemadsorção (HAD)

O HAD se baseia na propriedade de leucócitos de suínos infectados com o VPSA induzirem a adsorção de eritrócitos em suas membranas (Malmquist & Hay 1960, Malmquist 1962). Descrição sucinta da técnica: amostras de sangue colhidas com o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) e fragmentos de órgãos acomodados em embalagem que os mantinha resfriados (4° a 12°C) oriundos de suínos de várias regiões do país foram enviados ao LDPSA. Cerca de um grama de cada fragmento de tecido de suíno recebido foi macerado com areia estéril em graal, em seguida, homogeneizada em cinco a dez mililitros de meio de cultura contendo antibióticos. As suspensões de tecido obtidas foram clarificadas a 1000g por cinco minutos e o sobrenadante inoculado em cultura primária de leucócitos de suínos. As amostras foram submetidas ao diagnóstico diferencial de Peste suína clássica (Andrade 1980, Freitas, et al. 2006). Para o estabelecimento da cultura de leucócitos, sangue de suíno negativo para PSA foi colhido em garrafas estéreis, desfibrinados pela agitação manual suave com auxílio de bilhas de vidros. As amostras foram centrifugadas a 700g por trinta minutos. A suspensão contendo leucócitos ou "buffy coat" foi coletada e tratada com cloreto de amônia para eliminação das hemácias. Os leucócitos obtidos foram incubados a temperatura ambiente por 15 minutos centrifugados a 700g por 15

minutos e o precipitado de leucócitos lavado com meio de cultura ou tampão fosfato (PBS). Em seguida os leucócitos foram re-suspensos em meio Dulbecco modificados (DMEM) suplementado com antibióticos e 40% do soro de suíno que doou os leucócitos. A suspensão dos leucócitos foi distribuída em tubos de vidro. Os tubos foram incubados inclinados num ângulo de cerca de 45° na temperatura de 37°C. Cada amostra foi inoculada em três tubos (0,2mL/tubo) nas diluições de 1/10, 1/100 e 1/1000. Os Controles, Positivo e Negativo (não inoculado), foram incubados nas mesmas condições das amostras em teste. Depois de três dias, 0,2mL de eritrócitos de suíno foram adicionados a cada cultura de leucócito. As culturas foram lidas sob microscópio ótico diariamente durante dez dias para observação do fenômeno da hemadsorção e de efeito citopático (CPE). Sangue de suíno para a cultura de leucócito e para o fornecimento de eritrócitos era fornecido pela unidade de suínos da Fazenda governamental denominada Fazenda Modelo, em coleta semanal.

Fluorescência em amostras de tecidos de suínos (FATS)

A técnica de fluorescência em amostras de tecido baseada em Bool et al. (1969) foi aplicada para a detecção de antígenos virais do VPSA em impressões de tecidos de suínos. Os tecidos testados foram tonsilas, baço, linfonodos e fígado. Esta técnica se baseia na reação antígeno-anticorpo e é realizada aplicando sobre a impressão do tecido, uma solução contendo anticorpos (imunoglobulinas) específicos anti-VPSA (antígenos) previamente conjugados com isotiocianato de fluoresceína (fluores-

cein isothiocyanate conjugate - FITC). Controles positivos e negativos foram incluídos no teste para assegurar a correta interpretação das lâminas.

Organização dos dados e análise dos resultados

As informações pertinentes a cada amostra de suíno como a data da entrada no laboratório, origem da amostra (município e Estado), as mesorregiões geográficas e o número de registro e/ou código de amostra de cada um dos três Estados selecionados para análise foram compiladas em tabelas (Tabelas 1, 2, 3). Amostras testadas pelo HAD foram descritas em três colunas de acordo com o número de passagem em cultura de células para obter os resultados: primeira, segunda ou terceira passagens. Nas colunas do FATS foram listados os órgãos e os parâmetros aplicados para a definição da intensidade da fluorescência associada aos antígenos de VPSA descrita em marcações de cruzes e traços segundo a leitura registrada: um traço (-) negativo, ausência de marcação; um traço e uma cruz (-+) amostra fraco-positiva; duas cruzes (++) amostra positiva, e três cruzes ou mais (+++), amostra forte positiva, semelhante ao padrão de marcação de imunohistoquímica (Barbosa e Freitas, 2008). Todos os resultados do HAD e FATS obtidos foram classificados em planilhas XLS, Microsoft Office Excel 2003, para os cálculos de correlação de positividade e negatividade de cada uma das amostras. Uma quarta tabela foi construída com a análise geral dos resultados obtidos no Excel como positivo na HAD e negativo no FATS; positivo no FATS e negativo na HAD e positivo e negativo nos dois testes.

Tabela 1. Demonstrativo das amostras analisadas concomitantemente pelas duas técnicas HAD e FATS no Estado do Rio de Janeiro por município, mesorregião e intensidade de marcação nos órgãos investigados.

1978	Município	Mesorregião	Código por Amostra	HAD		FATS				Negativo
				1#	2#	T	B	L	F	
15/jun	Caxias	M	40	1		+	-	-	-	0
16/jun	Niterói	M	34 (15.1)	1		+	-	+	+	0
16/jun	Niterói	M	33/78	0			-			1
16/jun	Niterói	M	37/78	1		+		+	+	0
16/jun	B. J. Itabapoana	NO	26(38/78)	1			+	+		0
19/jun	Cantagalo	C	43	0		-	-	-	-	1
19/jun	Cordeiro	C	44	0			+	+		0
20/jun	Campos	N	55	0			+			0
20/jun	Rio Bonito	M	46	0		+	++	+		0
23/jun	B. Pirai	S	127 A	1			+			0
23/jun	B. Pirai	S	127 B	0			-			1
23/jun	Carmo	C	71	1			-	-		0
23/jun	B. J. Itabapoana	NO	128 D	1			-	+		0
23/jun	Silva Jardim	B	117	0		+-	+	+		0
23/jun	Maricá	M	64	1		++	-	++	-	0
24/jun	B. J. Itabapoana	NO	128	1			+	+	-	0
24/jun	Campos	N	129	0			+	+++		0
03/jul	Caxias	M	195	0	1		++	+	+	0
12/jul	S. Sebastião do Alto	C	258	1			++	+	+	0
12/jul	Itaguaí	M	264	0			+		+-	0
13/jul	S. Gonçalo	M	265	0				++		0
28/jul	Cordeiro	C	341	0				++		0
Parcial	14	6	22	10	1	6	11	14	5	3
Total	14	6	22	11 (50%)	18 (82%)	3 (13%)				

Mesorregiões: Baixada=B, Centro= C, Metropolitana = M, Norte=N, Noroeste NO, Sul=S. Órgãos FATS: T= tonsilas, B= baço, L=Linfonodos, F=Fígado

Tabela 2. Demonstrativo das amostras analisadas concomitantemente pelas duas técnicas HAD e FATS no Estado do Paraná nos meses de Junho e Julho de 1978 distribuídos por município, mesorregião e intensidade de marcação nos órgãos investigados.

1978	Município	Mesorregião	Código por amostra	HAD			FATS			Negativo
				1#	2#	3#	B	LN	F	
17/jun	Pérola	NO	36	0			-			1
22/jun	Jacarezinho	NP	80*	1			++	+++		0
22/jun	Jacarezinho	NP	81*	0			+	++		0
23/jun	Wenceslau Brás	NP	91* 36%	1			+	++	+	0
23/jun	Wenceslau Brás	NP	92	1			+		+	0
24/jun	Tapira	NO	135	0			-		-	1
27/jun	São José dos Pinhais	M	150	0			-	-	-	1
27/jun	Piraquara	M	149*(28,57%)		1		+	+		0
30/jun	Santa Helena	O	181	1			+		+	0
30/jun	Iporã	NO	185*(16,6%)		1		+			0
03/jul	Wenceslau Brás	NP	186*01(25%)		1		+++	++	++	0
05/jul	Castro	CO	211	0			0			1
07/jul	Umuarama	NO	218	1			+	+		0
07/jul	Xambrê	NO	219	0			+		+	0
07/jul	Curitiba	M	220*01 (0,8%)		1		0		0	0
07/jul	São João	NO	221	0			+			0
07/jul	Verê	SO	224	1			+	+++	+	0
07/jul	Umuarama	NO	233	0			0			1
07/jul	Cruzeiro do O	NO	234	0					0	1
07/jul	Sertanópolis	NC	235		1		+	+		0
07/jul	Jacarezinho	NP	236	0	0	0	+	++	0	0
07/jul	Wenceslau Brás	NP	237	0	0	0	+	++	+	0
10/jul	Nova Fátima	NP	256	1			+			0
13/jul	Nova Olímpia	NO	268	0			0			1
13/jul	Siqueira Campos	NP	266	1			0	0	0	0
13/jul	Ponta Grossa	CO	267	1			0		0	0
17/jul	Porto Vitória	SE	279	0			0		0	1
28/jul	Tijucas do Sul	M	342	0	0	0	+-		+-	0
28/jul	Nova Olímpia	NO	343	1			0		0	0
31/jul	Umuarama	NO	361	0	0	0	0	0	0	1
Parcial	22	8	30	10	5		17	10	8	9
Total	22	08	30	15 (50%)	17 (57%)	9 (30%)				

Mesorregiões Noroeste=NO, Norte Pioneiro =NP Metropolitana=M, Oeste=O, Centro Oriental=CO, Sudoeste=SO, Norte Central=NC, Sudeste=SE, Órgãos: Baço=B, Linfonodos=LN, Fígado=F.

* Focos que foram avaliados também pelo formulário de investigação epidemiológica de PSA apresentando o índice de mortalidade nos surtos entre parênteses.

Tabela 3. Demonstrativo das amostras analisadas pelas técnicas HAD e FATS no Estado de São Paulo: número de municípios, as mesorregiões e os órgãos investigados onde antígenos virais foram marcados.

Data Período	Municípios	Mesorregião	Amostras	HAD			FATS (± a ++)				Negativo
				1#	2#	3#	T	B	L	F	
29Jun/28Jul	5	Assis	08	2	3		-	4 (+)	2 (+)	2 (+)	2
23Jun/17Jul	4	Vale do Paraíba	05	1				4 (+)	3 (++)	1 (±)	1
23Jun/17Jul	3	Piracicaba	08	2		3		3 (++)	2 (++)		3
23ju/10Jul	5	Presidente Prudente	06	3				2 (+)		1 (+)	2
23-27Jun	2	Ribeirão Preto	03	1			1(+)	2(+)	1 (++)	1 (±)	0
23Jun-3Jul	2	Marília	05	1	1		1(±)	3 (+)	1 (+)	2 (+)	1
23Ju/17Jul	6	Campinas	09	3	2			3(±)	3 (+)	1 (+)	2
23Jun/27Jul	2	Araraquara	02	1	1		-				0
24Jun/17Jul	2	Macro- Metropolitana	06	0	2	0	1(+)	6 (+)	4 (++)	2 (+)	0
28/jun	1	Itapetininga	01	1				1 (+)		1 (+)	0
03/17Jul	2	São Paulo	03		1			0	0	0	1
Parcial	34	11	56	15	10	3	3	28	16	11	12
Total	34	11	56	28 (50%)	33 (58%)	12(21,4%)					

Órgãos: T= Tonsilas, Baço=B, Linfonodos=LN, Fígado=F. (± a ++) a maior marcação evidenciada no FATS por mesorregião.

Mesorregiões

Os municípios dos Estados selecionados foram distribuídos em mesorregiões, pois segundo o critério do

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) as Mesorregiões congregam municípios que além da proximidade geográfica apresentam similaridades econômi-

Tabela 4. Correlação de resultados das amostras testadas simultaneamente na HAD e FATS nos estados do RJ, SP e PR na fase emergencial da erradicação da PSA no Brasil.

Estados	Amostras	Em pelo menos 1 teste	HAD+ FATS-	FATS+ HAD-	HAD/ FATS+	HAD/ FATS-
RJ, SP, PR	108	83 (76,85%)	15 (18%)*	28 (34%)*	40	25

* (%) Em relação as amostras consideradas positivas.

cas e sociais. Neste estudo, 14 municípios do Estado do Rio de Janeiro (Tabela 1) e 22 do Estado Paraná (Tabela 2) foram listados, analisados e distribuídos pelas mesorregiões. No Estado de São Paulo, os 56 municípios analisados foram agrupados nas mesorregiões evitando assim uma tabela muito grande (Tabela 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PSA continua sendo um dos grandes problemas para a produção de suínos. As taxas de mortalidade e morbidade provocada pela infecção com VPSA associadas à interdição do mercado e a proibição do comércio de suínos vivos e produtos de suínos levam a incomensuráveis prejuízos aos suinocultores e a indústria suinícola. Estes prejuízos são ampliados pela restrição às exportações de outros produtos da agropecuária de países afetados. O incremento de intercâmbio entre nações quer mercantil quer turístico intensifica o risco de disseminação do VPSA. A inexistência de uma vacina preventiva exacerba a importância desta virose para segurança global de alimentos (Arzt et al. 2010).

No Brasil, o combate a PSA se iniciou com o estabelecimento do Programa de Erradicação da PSA, em duas fases: a fase emergencial - período do final do primeiro semestre de 1978 a 1979 e a fase específica que consolidou o programa nacional de erradicação da PSA e se estendeu até 1984 quando finalmente a PSA foi totalmente erradicada do território brasileiro (Lyra 2006). As técnicas HAD e FATS para o diagnóstico laboratorial de PSA eram os padrões de referência da época, contudo, facilidade de implantação desses métodos em conjunto à fidedignidade dos resultados produzidos faz com que ainda hoje sejam recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal para o diagnóstico laboratorial como também para redimir dúvidas oriundas de métodos moleculares (OIE, 2012). Fatores limitantes das duas técnicas foram reconhecidos: algumas cepas do VPSA podem não induzir o fenômeno de hemadsorção aos leucócitos na primeira passagem (Leitão et al. 2001). E, no FATS, a presença de anticorpos em animais infectados com VPSA cronicamente pode bloquear a reação do anticorpo secundário marcado com FITC com a célula infectada, e assim interferir no resultado do FATS.

Esses fatores limitantes são minimizados quando se aplicam as duas técnicas, acelerando a obtenção dos resultados. Em uma campanha de erradicação a rapidez na obtenção de resultados fidedignos é imprescindível. Não obstante, um resultado positivo em uma das técnicas é suficiente para confirmar a infecção com o VPSA e desencadear todas as providências necessárias para combate desta devastadora virose. Neste trabalho as amostras testadas simultaneamente nas duas técnicas foram analisadas para demonstrar a complementaridade dos métodos. Entretanto, quando uma amostra de tecido de um mesmo animal suspeito apresenta resultado positivo nas duas metodologias, HAD e FATS, que são sistemas biológicos distintos, isolamento em células e detecção de antígenos virais em tecidos, também, corroboramos para dirimir qualquer dúvida em relação à fidedignidade dos resultados encontrados durante a campanha de erradicação (Freitas & Lyra 2010, 2011).

O LDPSA iniciou seus trabalhos em 12 de junho de 1978, testando amostras de tecidos de suínos sob suspeita de infecção com VPSA, oriundos de diferentes Estados brasileiros incluindo RJ, SP, PR. No período de doze a trinta de junho de 1978, das 178 amostras de tecido recebidas 89 municípios de onze estados brasileiros, 152 puderam ser testadas e destas, 74 apresentaram resultados positivos no HAD e no FATS. Enquanto no mês de julho, foram testadas 220 amostras de onze estados destas, 56 amostras foram positivas no HAD e 53 no FATS (Freitas & Lyra 2010). O Estado do Rio de Janeiro foi o alvo inicial para o intensivo combate a PSA. A eficácia das ações de combate foi demonstrada em vários estudos realizados anteriormente (Lyra 2006). Contudo, a comparação dos resultados das amostras testadas pelas duas técnicas concomitantemente reafirma a rapidez dessas ações, tanto na coleta das amostras como na realização dos testes. O estudo de correlação dos testes HAD e FATS incluiu 22 amostras do RJ, 30 do PR e 56 de SP (Tabelas 1, 2, 3). No resultado global dessa comparação podemos observar que nos primeiros dois meses do plano de emergência no RJ cerca de 50% das amostras foram positivas no HAD, mais de 80% foram positivas no FATS e 13% amostras negativas nos dois testes. (Tabela 1). O maior número de resultados positivos no FATS sugere que a coleta das amostras se deu no início do estabelecimento da infecção, antes mesmo dos animais montarem a resposta de anticorpos pois, como citado anteriormente, o fator limitante do FATS é a formação do complexo antígeno-anticorpo nos tecidos infecta-

dos que pode bloquear a interação dos antígenos virais e o anticorpo indicador. E assim, a produção de anticorpos pelos animais infectados geralmente em infecções subclínicas e/ou crônicas, pode diminuir o potencial de aplicação do FATS no diagnóstico do VPSA (McDaniel 1981). O desempenho da HAD depende das condições dos cultivos celulares e a carga viral nos tecidos suspeitos como também, as condições das amostras que podem interferir e prejudicar os resultados ou mesmo impedir a realização do teste. Uma vantagem é que HAD permite aumentar o título viral em passagens seqüenciais em novos cultivos celulares. Então, a segunda e terceira passagens, permitem o diagnóstico do vírus mesmo amostras com títulos baixos ou insuficientes. Como podemos observar, ainda no RJ que somente em uma amostra de suíno, do município de Duque Caxias, o VPSA foi diagnosticado em segunda passagem. Este fato pode ser associado à baixa carga viral na amostra analisada, que paralelamente também foi positiva pelo FATS aplicado nos fragmentos de baço (Tabela 1). No Estado do Paraná trinta amostras testadas pelas duas técnicas, HAD e FATS, apresentaram um percentual de positividade de 50 e 57%, respectivamente. Cinco amostras foram diagnosticadas somente em segunda passagem no HAD, enquanto, 30% foram negativas nos dois testes (Tabela 2). Enquanto, em São Paulo, das 56 amostras testadas simultaneamente na HAD e FATS, 28 (50%) positivas pelo HAD e 33 (58%) positivas pelo FATS e 12 (21,4%) negativas. Contudo a marcação fluorescente das amostras foi desde fraca positiva a positiva e nenhuma amostra forte positiva, acrescentando que algumas amostras que só puderam ser diagnosticadas como positiva após novas passagens pela re-inoculação em cultivo de leucócitos até a terceira passagem (Tabela 3). Isto sugere uma alteração no perfil do diagnóstico laboratorial com relação ao observado nos focos iniciais no Rio de Janeiro e mesmo no Paraná, como por exemplo, as amostras oriundas da mesorregião Paranaense NP que foram marcadas com fortemente positivas. Não obstante, o número de amostras testados em SP seja 40% superior ao amostrado no Paraná, os resultados destes dois Estados podem ser considerados similares no mesmo período (SP: 50% e 58%; PR: 50% e 57%).

Quando as amostras foram classificadas para a comparação uma a uma quanto à positividade e negatividade foi observado que no universo de 108 amostras submetidas a ambos os testes, 83 (76,85%) foram positivas em, pelo menos um dos testes, o que caracterizava positividade para PSA

(Tabela 4). Em uma análise mais detalhada, dentre as amostras positivas, 28 apresentaram resultado negativo para HAD e 15 apresentaram resultado negativo para FATS, respectivamente 34% e 18%, a partir do que se conclui que a realização de ambos os testes implicam a redução de resultados finais falso-negativos, conferindo um diagnóstico mais preciso da doença nos rebanhos. Assim sendo, as duas técnicas podem ser consideradas como complementares, mas cada uma trazendo uma informação adicional ao diagnóstico viral. Conseqüentemente a implantação das duas é recomendável no rastreamento e diagnóstico do VPSA.

Além do tecido sanguíneo aplicado preferencialmente na HAD, a pesquisa de antígenos virais foi direcionada para as tonsilas, baço, linfonodos e também do fígado. Neste estudo foi observado que a marcação de duas ou mais cruces que representa positivo e fortemente positivo foi evidenciada nos fragmentos do baço e linfonodos (Tabelas 1-3) o que sugere que além do sangue, estes órgãos podem ser considerados como alvos preferenciais para o diagnóstico do vírus em campanhas de erradicação da PSA corroborando o tropismo do VPSA por órgãos associados ao sistema retículo-endotelial (Carnero et al. 1982).

Os dois primeiros meses do programa de combate a PSA foram cruciais no combate PSA que se alastravam pelo país. No Estado do Rio de Janeiro, grande maioria dos municípios que tiveram suínos infectados pelo VPSA pertencia à mesorregião Metropolitana (Tabela 1). Contudo focos de PSA foram diagnosticados em Municípios distante até 300 km como no caso de Campos dos Goitacazes na mesorregião Norte (N). A ocorrência de focos distantes foi associada às conexões e extensões comerciais da granja de Paracambi, como bem descrito por Machado Jr (1990).

A cidade de Paracambi se localiza próximo a rodovia de acesso a Região Sul, e a várias cidades da Região Sudeste. A Região Sul do Brasil já despontava como um grande centro produtor desenvolvendo a produção de suíno tipo carne e intensificando a venda de suínos e seus produtos para outras regiões do país. O tráfego rodoviário intenso entre essas regiões aumentava o risco de dispersão do vírus do Estado do Rio de Janeiro para outros Estados. Esta possibilidade levou o rastreamento para outros Estados incluindo São Paulo, Paraná (Lyra 2006). No Paraná, dos 37 municípios investigados pelo diagnóstico de PSA, em 22 (60%) dos municípios as amostras de suínos foram analisadas tanto pelo HAD como pelo FATS.

Esses resultados quando analisados junto às informações dos formulários de investigação epidemiológica de PSA (Tabela 2) descrevem o índice de mortalidade induzido pela infecção inferior a 40% como, por exemplo, nos municípios de Curitiba com 0,8%, Iporã com 16,6%, Wenceslau Brás com dois rebanhos de suínos afetados pela PSA apresentou 25% e 36%, respectivamente e Piraquara que o índice de mortalidade alcançou 28,57% (Freitas e Lyra, 2011). Essas taxas de mortalidade sugerem a presença de cepas de baixa virulência nos surtos de PSA no Paraná. Cepas de baixa virulência têm sido isoladas em diferentes surtos de PSA em suínos domésticos desde dos surtos na península Ibérica nos final dos anos 50 e em 1960 e Malta em 1978 (Mebus & Schlafer 1982, Villeda et al. 1993, OIE 2012).

O foco índice em Paracambi foi notificado em maio de 1978, se a infecção com VPSA em rebanhos paranaenses foi adquirida em animais oriundos do RJ, considerando que as notificações ocorreram somente a partir dos meados de junho, ou seja, mais de trinta dias após o surto de índice não é impossível que o vírus tenha se dispersado através de animais ou em produtos de animais infectados subclínicamente. A infecção subclínica é associada a cepas virais de baixa virulência do VPSA, conforme já sugerido por Lyra (1980), Hess (1981), Mebus & Schlafer (1982), Peritz (1983). A maioria das amostras do Paraná foi oriunda das mesorregiões Noroeste (NO) e Norte Pioneiro (NP) ambas as mesorregiões de fronteira com o Estado de São Paulo o que sugere a possibilidade de disseminação do VPSA pelo trânsito de animais nessas fronteiras.

Concluindo, a comparação das amostras analisadas pelas duas técnicas HAD e FATS demonstra a eficácia do programa no diagnóstico e rastreamento do VPSA. O Estado do Rio de Janeiro onde o primeiro foco de PSA foi identificado os resultados foram claramente positivo nos dois testes sendo intensamente marcado no FATS. Os resultados fraco-positivos diagnosticadas pelo FATS conjuntamente com o isolamento do vírus pelo HAD obtido após repiques sucessivos das suspensões virais em culturas de leucócitos podem também sugerir a uma mudança no perfil das populações virais existentes no país viral e a presença de cepas de vírus de baixa virulência na população viral infectante. Neste estudo foi sugerido que além do sangue, o baço e linfonodos pela intensa marcação no FATS, podem ser considerados como alvos preferenciais para a investigação do vírus nos exames laboratoriais. A distribuição pelas mesorregiões agrupando os municípios pelas características geográficas e

culturas, sugere o traçado terrestre do vírus entre o NP e NO do Paraná e o Sul de São Paulo.

Atualmente técnicas moleculares como o PCR (polimerase chain reaction), podem ser aplicadas para o diagnóstico viral, contudo as técnicas de HAD e FATS ainda são recomendadas para o diagnóstico viral (OIE 2012). A facilidade na implantação das técnicas HAD e FATS e a complementaridade dos resultados as fortalecem a importância dessas técnicas para o diagnóstico da PSA. Uma política pública que comporte estabelecimento de laboratório de diagnóstico referencial e estabelecimento de planificação de estratégias de prevenção à entrada da PSA no País deve ser pensada e estabelecida. A experiência bem-sucedida de 1978 pode ser aproveitada como base para o país e para o exterior.

Agradecimentos. Este trabalho foi custeado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

REFERÊNCIAS

- Andrade C.M. Diagnóstico Laboratorial da Peste Suína Africana no Brasil. *Informativo Lanara*, Ano II, 10:20-24, 1980.
- Andrade C.M. African swine fever in Brazil: three years experience in the laboratory. CEC/FAO Experts consultation on African swine fever research. Sardinia, 1981, p.152-160.
- Arzt J., White W.R., Thomsen B.V. & Brown C.C. Agricultural Diseases on the Move Early in the Third Millennium. *Vet. Pathol.*, 47:15-27, 2010.
- Barbosa C.N. & Freitas T.R.P. Implementation of immune-histochemical (IHC) technique applied to diagnostic of porcine circovirus type-2 antigen in swine tissues. *Rev. Ciên. Méd. Biol.*, 7:211-219, 2008.
- Boal P.H., Ordas A. & Sanchez Botija C. The diagnosis of African Swine Fever by immunofluorescence. *Bull. Int. Epizoot.*, 72:819-839, 1969.
- Carnero R. Fiebre Porcina Africana: conocimiento de la enfermedad. *IICA: Serie Salud Animal*, 3:244, 1982.
- Freitas T.R.P. & Lyra T.M.P. African Swine Fever virus in Brazil: historic and achievements over laboratorial virus and antibody screening in the emergence phase. *Virus: Reviews and Research*, 15:213-213, 2010.
- Freitas T.R.P. & Lyra T.M.P. African Swine Fever virus low and moderate virulence strains infections in Brazilian outbreaks, 1978. *J. Agron. Vet. Sci.*, 2011, p.1-3. Electronic media.
- Freitas T.R.P., Caldas L.A., Espírito Santo M.P. & Meneses M.D.F. Conceitos Básicos e Técnicas em laboratório de Virologia Animal. Gráfica e Editora Tavares, Pedro Leopoldo, 2006. 176p.
- Hess W.R. African Swine Fever: reassessment. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 25:39-69, 1981.
- Iyer L.A., Balaji S., Koonin E.V. & Aravind L. Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.*, 117:156-184, 2006.
- Leitão A., Cartaxo C., Coelho R., Cruz B., Parkhouse R.M.E., Portugal F.C., Vigário J.D. & Martins C.L.V. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J. Gen. Virol.*, 82:513-523, 2001.
- Lyra T.M.P. A peste suína africana de baixa mortalidade. *Boletim de Defesa Sanitária Animal*, Número especial, 1980, p.51-59.
- Lyra T.M.P. Program of control against swine fever in Brazil. *Proceedings of Swine Fever International Symposium*, CEC-FAO, Sardinia, Italy, 1981, p.25-35.

- Lyra T.M.P. La erradicación de la Peste Porcina Africana en el Brasil, 1978-1984. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 25:93-103, 2006.
- McDaniel H.A. African Swine Fever, p.237-245. In: Leman A.D., Straw B., Glock R.D., Mengeling W.L., Penny R.H.C. & Scholl E. (Eds), *Diseases of Swine*. 6th ed. Iowa State University, USA, Ames, 1981.
- Machado Junior T.L. The development of aids to the prevention and control of exotic animal diseases in Brazil. Tese, University of Reading, Great Britain, 1990. 176p.
- Malmquist W.A. Propagation, modification and hemadsorptiort of African Swine Fever virus in cell cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 23:241-247, 1962.
- Malmquist W.A. & Hay D. Hemadsorption and cytopathic effect produced by ASFV in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.*, 21:104-108, 1960.
- Mebus C.A. & Schlafer D.H. African Swine Fever in Americas. A changing disease. *First International Conference on the Impact of Viral Disease on the Development of Latin American and the Caribbean Region*, 1:198-202, 1982.
- Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E. & Dixon L.K. Molecular epidemiology of African Swine Fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.*, 151:2475-2494, 2006.
- OIE. African Swine Fever, p.1069-1082. In: *OIE Terrestrial Manual*. Sec. 2.8, Suidae, 2012.
- OIE-Wahis. World Organization for Animal Health - The World Animal Health Information System (<http://web.oie.int/wahis/public>) Acesso: fevereiro, 2013.
- Pan I.C., De Boer C.J. & Hess W.R. African swine fever: application of immuno-electro-osmophoresis for the detection of antibody. *Can. J. Comp. Med.*, 36:309-316. 1972.
- Peritz F. Peste Porcina Africana em las Américas. Diagnóstico de La salud animal em las Américas. *Organizacion Panamericana de La Salud. Publicación Científica*, 452:118-123, 1983.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., Mur L. & Martínez-López B. African Swine Fever: An Epidemiological Update. *Trans. Emerg. Dis.*, 59 (Suppl. 1):27-35, 2012.
- Villiers E.P., Gallardo C., Arias M., Silva M., Upton C., Martin R. & Bishop R.P. Phylogenomic analysis of 11 complete African Swine Fever virus genome sequences. *Viol.*, 400:128-136, 2010.
- Villeda C.J., Williams S.M., Wilkinson P.J. & Viñuela E. Haemostatic abnormalities in African Swine Fever. A comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). *Arch Virol.*, 130:71-83, 1993.
- Yanez R.J., Rodriguez J.M., Nogal M.L., Yuste L., Enriquez C., Rodriguez J.F. & Vinuela E. Analysis of the complete nucleotide sequence of African Swine Fever virus. *Viol.*, 208:249-278, 1995.